

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Eingereicht an der Fakultät für Biologie  
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Intravitalmikroskopische Studien im  
Mausmodell mit kraniellen Fenstern:  
Fluoreszenzdarstellungen bei der Diagnostik und  
antiangiogenen Therapie von Gehirntumoren**

Vorgelegt von  
David Brucker  
aus München

München  
2014





### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

### **Erklärung**

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. Jochen Herms betreut und von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß vor der Fakultät für Biologie vertreten. Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den.....

David Brucker

Erstgutachterin:	Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachter:	Herr PD Dr. Steffen Dietzel
Sondervotum:	Herr Prof. Dr. Jochen Herms
Dissertation eingereicht am:	20.02.2014
Tag der mündlichen Prüfung:	06.08.2014



„Beim Aufstehen am Morgen drei oder vier Meter rückwärts durchs Zimmer getaumelt und mit Kopf und Nacken gegen die Tischkante geknallt. Mit Rückenschmerzen zum Westhafen, S-Bahn zu Dr. Vier. Befund schlecht wie erwartet. Avastin ohne Wirkung, Glioblastom beiderseits progressiv. Ende der Chemo. OP sinnlos.

Ich weiß, was das bedeutet. Wie lange habe ich noch, zwei oder drei Wochen? Noch weniger, ein paar Tage?

Nein. So wenig erwarte ich nicht, sagt Dr. Vier, eher mehr. Mehr. Zwei, drei Monate. Kann auch sein, vier. Kann sein, fünf. Mit Glück auch sechs.

Viele Taschentücher habe ich in dieser Praxis nicht gebraucht. Heute brauche ich eins.“

(Wolfgang Herrndorf, Arbeit und Struktur, 15.07.2013)



## **Zusammenfassung**

Für maligne Tumorerkrankungen des Gehirns gibt es keine Heilung. Betroffen sind sowohl Patienten primärer maligner Gehirntumore wie dem Glioblastom, als auch Krebspatienten mit Gehirnmetastasen. Neuartige Ansätze zur Diagnostik und Therapie von Gehirntumoren und Gehirnmetastasen sind ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, in dem Innovationen bildgebender Verfahren eine wichtige Rolle spielen werden. In der vorliegenden Arbeit werden präklinische Tumormodelle des Gehirns mit kraniellen Fenstern zweiphotonenmikroskopisch untersucht.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methodik zur Verbesserung der Sicherheit und Verlässlichkeit von stereotaktischen Eingriffen in der Diagnostik von Gehirntumoren im Mausmodell erprobt. In diesem Projekt sollte eine miniaturisierte endoskopische Sonde eingesetzt werden, um Gehirntumore bei einer Biopsie durch eine Fluoreszenzmarkierung zu erkennen. Die Tumore sollten durch 5-Aminolävulinsäure induzierte Protoporphyrin IX-Fluoreszenz visualisiert werden. Im Mausmodell mit humanen Glioblastomzellen gelang es auf diese Weise die Region des Tumors klar zu identifizieren. Weiterhin wurden mit dieser Technik Blutgefäße mit Indocyaningrün und Fluorescein dargestellt. Die Technik zur fluoreszenzbasierten Tumordetektion fand auch bereits eine erste Anwendung bei der Biopsie eines humanen Patienten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden dynamische Effekte der Inhibition durch Antikörper zweier angiogener Faktoren untersucht: VEGF und Angiopoietin-2. Avastin (ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF) ist ein zugelassenes Medikament gegen VEGF bei verschiedenen Tumoren. Wirkstoffe gegen Angiopoietin-2 sind noch in der Phase früher klinischer Studien. In dieser Arbeit wurden zweiphotonenmikroskopische Aufnahmen von Tumorzellen, Blutgefäßen und Makrophagen im Tumor erstellt, um neben konventionellen Messgrößen wie Überleben und Tumorgroße auch dynamische Veränderung im Verlauf der Behandlung zu untersuchen. Antikörper gegen VEGF und Angiopoietin-2 bewirkten verschiedene günstige Effekte im Mausmodell von Gehirnmetastasen aus der Lunge. Die gemeinsame Applikation beider Antikörper bewirkte eine Verlängerung der Überlebenszeit der Tiere. Die Inhibition von VEGF war für einen Großteil der positiven Effekte, darunter verringertem Tumorwachstum, verringerter Gefäßpermeabilität und normalisierter Gefäßmorphologie verantwortlich. Die Addition von Antikörpern gegen Angiopoietin-2 verbesserte die Wirkung der Inhibition von VEGF bei einer niedrigen Dosis, was sich auch deutlich in der verlängerten Überlebenszeit niederschlägt. Bei einem Vergleich mit einer Chemotherapie überlebten die Tiere bei einer antiangiogenen Behandlung deutlich länger als Tiere, die eine Chemotherapie erhielten. Die Kombination von antiangiogener Behandlung und Chemotherapie war in Hinsicht auf das Gesamtüberleben jedoch nicht förderlich. Letztlich wurde die Rolle der Mikroglia und Makrophagen während einer antiangiogenen Behandlung untersucht. Hierfür wurden immundefiziente Mäuse mit Tieren der Linie  $Cx_{3}cr1^{GFP}$ , deren Mikroglia GFP exprimieren, verkreuzt. Ein direkter Einfluss auf die Mikroglia dichte wurde nicht beobachtet, allerdings spielt die regionale Mikroglia dichte eine Rolle bei Normalisierung oder Niedergang der Blutgefäße in verschiedenen Tumorregionen.



## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
1.1	Maligne Tumorerkrankungen des Gehirns	15
1.2	Diagnostik von Hirntumoren und die stereotaktische Biopsie	16
1.3	Die Blut-Hirn-Schranke	17
1.4	Behandlung von malignen Gehirntumoren	18
1.5	Tumorangiogenese	19
1.6	Antiangiogene Therapien und vaskuläre Normalisierung	24
1.7	Mausmodelle von Glioblastomen und Gehirnmetastasen	28
1.8	Zweiphotonenmikroskopie in Mausmodellen mit kraniellen Fenstern.	29
2	Zielsetzung	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Geräte, Werkzeuge und Utensilien	35
3.2	Verbrauchsmaterialien	36
3.3	Zellbiologische Methoden	37
3.3.1	Wachstumsbedingungen von Zelllinien	37
3.3.2	Verwendete humane Tumorzelllinien	37
3.3.3	Zellkulturmedien	37
3.3.4	Zellzahlbestimmung	38
3.3.5	Präparation der Zellen für intrakranielle Injektionen	38
3.3.6	Einfrieren und Auftauen	38
3.4	Tierversuche	38
3.4.1	Mauslinien	38
3.4.1.1	NMRI: Foxn1 <sup>nu</sup>	38
3.4.1.2	C57BL/6J:Cx <sub>3</sub> cr1 <sup>GFP</sup>	39
3.4.1.3	Verkreuzung einer doppelt transgenen Linie: Cx <sub>3</sub> cr1 <sup>GFP</sup> x Foxn1 <sup>nu</sup>	39
3.4.2	Maushaltung	39
3.4.3	DNA-Präparation aus Schwanzspitzen	39
3.4.4	Cx <sub>3</sub> cr1 <sup>GFP/+</sup> Genotypisierung	39
3.4.5	Narkosen	41
3.4.6	Operation des kraniellen Fensters	41
3.4.7	Tumorzellinjektionen ins Gehirn	43
3.4.8	Zweiphotonenmikroskopie	45
3.4.9	Experimente mit Sondenvorschub ins Gehirn	48
3.4.10	Injektion von Farbstoffen	50
3.4.11	Applikation von therapeutischen Antikörpern und Zytostatika	52
3.5	Auswertungen	52
3.5.1	Bilderstellung, Bildanalyse und Quantifizierung	52
3.5.2	Statistik	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Neurotax: Optische Unterstützung der molekularen Diagnostik in der Neurochirurgie	55

4.1.1	Sondenbasierte Detektion von Glioblastomen im Mausmodell durch 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenz	57
4.1.2	Sondenbasierte Darstellung von Blutgefäßen des Gehirns durch ICG oder Fluorescein	58
4.1.3	Fluoreszenzgestützte stereotaktische Biopsie am Glioblastompatienten	62
4.2	Antiangiogene Therapie von Gehirnmetastasen: Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Dynamik der vaskulären Normalisierung durch Inhibition von VEGF und Angiopoietin-2	67
4.2.1	Analyse von Überlebenszeit und Tumorwachstum nach Inhibition von VEGF und Angiopoietin-2	68
4.2.2	Blutfluss, Gefäßdurchmesser und Gefäßvolumen	70
4.2.3	Blutgefäßpermeabilität für Fluorescein-Dextran (70 kDa)	75
4.2.4	Penetration von Natrium-Fluorescein und fluoreszenzmarkierten Antikörpern	78
4.2.5	Antiangiogene Behandlung in Kombination mit Chemotherapie (Irinotecan und Etoposid)	80
4.2.6	Intravitalmikroskopie von Mikroglia und Makrophagen während des Wachstums von Gehirnmetastasen und antiangiogener Behandlung	85
5	Diskussion	93
5.1	Neurotax: Optische Biopsie zur molekularen Diagnostik in der Neurochirurgie	93
5.1.1	Fluoreszenzbasierende Unterstützung bei der Diagnostik von Tumoren	93
5.1.2	Fluoreszenzbasierende Früherkennung von Blutgefäßen bei Biopsien	95
5.1.3	Präklinische und klinische Beurteilung der Ergebnisse und Ausblick	96
5.2	Antiangiogene Therapie von Gehirnmetastasen: Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Dynamik der vaskulären Normalisierung durch Inhibition von VEGF und Angiopoietin-2	97
5.2.1	Vorteile und Nachteile der Zweiphotonen-Mikroskopie mit chronischen kraniellen Fenster in der Krebsforschung	97
5.2.2	Etablierung der in vivo 3D Tile-Scan Technik zur chronischen Untersuchung von Gehirntumoren im Mausmodell	99
5.2.3	Antiangiogene Monotherapie von Gehirnmetastasen	100
5.2.4	Kombination von antiangiogener Behandlung und Chemotherapie	104
5.2.5	Intravitalmikroskopie von Mikroglia und Makrophagen während des Wachstums von Gehirnmetastasen und antiangiogener Behandlung	107
5.2.6	Zusammenfassung, klinische Relevanz und Ausblick	110
6	Abkürzungsverzeichnis	113
7	Literaturverzeichnis	115
8	Anhang	127
8.1	Lebenslauf	127
8.2	Eigene Veröffentlichungen	128
8.2.1	Publikationen	128
8.2.2	Vorträge	129
8.2.3	Poster	129
8.3	Danksagung	131



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Formen der Tumorangiogenese	21
Abbildung 2: VEGF und Angiopoietin-2 bei der sprossenden Angiogenese	23
Abbildung 3: Schematische Darstellung von gesunden Gefäßen, Tumorangiogenese, vaskulärer Normalisierung und inadäquaten Gefäßen	26
Abbildung 4: Operation des kraniellen Fensters	42
Abbildung 5: Öffnen des Fenster zur Tumorimplantation	44
Abbildung 6: Halterung und Mikroskopisch für Intravitalmikroskopie	46
Abbildung 7: In vivo 3D Tile-Scan	47
Abbildung 8: Endoskopische Fasersonde (Neurotax), Farbstoffe und Detektion	49
Abbildung 9: Zweiphotonanregungs- und Emmissionsspektren	51
Abbildung 10: Vorschub der endoskopischen Neurotax-Sonde ins Mäusegehirn	57
Abbildung 11: Oberflächliche endoskopische Darstellung von Gefäßen mit ICG und Fluorescein	59
Abbildung 12: Bildverbesserungstechniken bei der Blutgefäßdarstellung mit 2x-GRIN-Linse	60
Abbildung 13: Sondenvorschub im gesunden Gehirn zur Gefäßerkennung mit Fluorescein	61
Abbildung 14: Stereotaktischer Eingriff mit optischer Unterstützung zur Gliomdiagnostik eines humanen Patienten	63
Abbildung 15: Vergleich des PpIX-Sondensignals mit der Histologie	64
Abbildung 16: Überleben und Tumorwachstum während antiangiogener Therapie	69
Abbildung 17: Flussgeschwindigkeiten roter Blutkörperchen am Behandlungstag 6	71
Abbildung 18: Gefäßdurchmesser und Gefäßvolumen während antiangiogener Behandlung	72
Abbildung 19: Zeitverlauf einzelner Tumorregionen über 30 Behandlungstage	73
Abbildung 20: Permeabilität für 70 kDa-Dextran-Fluorescein	77
Abbildung 21: Eigenschaften der Penetration von Natrium-Fluorescein (332 Da) im Tumor	78
Abbildung 22: Verteilung eines Alexa 488-anti-c-Met-Antikörpers in vivo	79
Abbildung 23: Zeitverlauf einer Acridinorange Injektion zur Zelltodbestimmung über 24 h	82
Abbildung 24: Verlauf der Acridinorangefärbung zur Zelltodbestimmung während einer Chemotherapie	83
Abbildung 25: Überleben und Tumorwachstum bei Chemotherapie	84
Abbildung 26: PC14-PE6 Tumor im Gehirn einer $Cx_{3}cr1^{GFP/+}$ x $Foxn1^{nu/nu}$ Maus	85
Abbildung 27: Mikroglia beim Rückgang eines Tumors	86
Abbildung 28: Dreifarbandarstellung von Blutgefäßen, Mikroglia und Tumorzellen in vivo.	87
Abbildung 29: Zeitserie von Makrophagenbewegungen innerhalb eines Tumors.	88
Abbildung 30: Mikroglia/Makrophagendichte im Zeitverlauf	90
Abbildung 31: Mikroglia-dichte, vaskuläre Normalisierung und lokaler Tumorzellrückgang	91
Abbildung 32: Lokale Mikroglia-dichte und vaskuläre Normalisierung	92



# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Tumorerkrankungen des Gehirns

Das Glioblastom (Glioblastoma multiforme) ist der häufigste primäre maligne Tumor des Gehirns und macht etwa 50% der primären Hirntumoren (Gliome) des zentralen Nervensystems aus (Preusser et al., 2011). Nach der Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems der Weltgesundheitsorganisation (Louis et al., 2007) werden Glioblastome als äußerst bösartige Astrozytome entsprechend einem Grad IV Tumor eingestuft. Hauptkriterien für die Unterscheidung von niedriggradigen Astrozytomen sind das Auftreten von Nekrosen und eine mikrovaskuläre Proliferation (Louis et al., 2007). Die Inzidenz von Glioblastomen beträgt in entwickelten Ländern 3-4 Fälle pro 100.000 Einwohner jährlich (Ohgaki & Kleihues, 2005; Dolecek, Propp, Stroup, & Kruchko, 2012). In nur etwa 5 % der Glioblastom-Fälle ist eine weniger maligne Vorläuferläsion bekannt, in diesen Fällen spricht man von einem sekundären Glioblastom (Ohgaki & Kleihues, 2013a). Das durchschnittliche Alter der Erstdiagnose primärer Glioblastome liegt bei 62 Jahren, während es für sekundäre Glioblastome bei 45 Jahren liegt. Abgesehen von ionisierender Strahlung und einer genetischen Prädisposition in seltenen genetischen Tumorsyndromen sind bisher keine weiteren Risikofaktoren nachgewiesen (Preusser et al., 2011). Die mediane progressionsfreie Überlebenszeit von Glioblastompatienten beträgt 7 Monate, die mediane Gesamtüberlebenszeit 15 Monate bei der derzeit bestmöglichen Therapie (Stupp et al., 2005).

Unter den bösartigen Tumorerkrankungen des Gehirns treten nur Gehirnmetastasen häufiger auf als Glioblastome. Gehirnmetastasen entstehen aus einzelnen oder mehreren Tumorzellen, die sich von einem Tumor in einem anderen Organ des Körpers lösen und über den Blutkreislauf das Gehirn erreichen. Erhebungen zu Gehirnmetastasen schwanken zwischen den wenigen vorhandenen Studien, da Patienten zunächst aufgrund des primären Tumors behandelt werden und nicht zwingend durch die Gehirnmetastasen versterben (Levitt & Silbergeld, 2013). Bei etwa 8,3 bis 11 von 100.000 Einwohnern jährlich treten Gehirnmetastasen auf (Zhang et al., 2012). Die meisten Fälle treten bei Patienten mit Lungenkarzinom (16,3-19,9%), dem malignem Melanom (6,9-7,4%), Nierenzellkarzinom (6,5-9,8%) und Mammakarzinom (5,0-5,1%) auf (Barnholtz-Sloan et al., 2004; Preusser et al., 2012a; Schouten et al., 2002). Es wird vermutet, dass die tatsächliche Zahl höher liegt und etwa zwischen 20 und 40% aller Patienten mit malignen Tumoren Gehirnmetastasen entwickeln (Preusser et al., 2012a; Soffietti et al., 2008). Insgesamt, bedingt durch das häufige Auftreten der Primärtumoren, machen Lungentumoren (40-50%) und Brustkrebs (20-30%) den Großteil des Ursprungs der Fälle von Gehirnmetastasen aus (Barnholtz-Sloan et al., 2004). Die Prognose für Patienten mit Gehirnmetastasen ist ebenfalls sehr schlecht, mit einem medianen Überleben von 3 Monaten in ungünstigen Fällen und bis zu 19 Monaten in günstigen Fällen (Preusser et al., 2012a). Die Inzidenz von Gehirnmetastasen scheint in den letzten Jahren zu steigen (Kienast & Winkler, 2010). Einerseits hängt dies mit der steigenden Inzidenz von Lungenkarzinomen zusammen, andererseits mit den besseren Therapiemöglichkeiten der Primärtumoren. Da Patienten mit metastasierenden Tumoren

inzwischen länger überleben, steigt die Zeitdauer, in der sich eine Gehirnmetastase ausbilden kann. Während es immer mehr Behandlungsoptionen für den Primärtumor gibt, bleiben die Behandlungsoptionen für Gehirnmetastasen limitiert.

Eine Schädigung des Gehirns durch Tumore und durch deren Behandlung bedroht nicht nur das Leben der Patienten, sondern beeinträchtigt auch deren Persönlichkeit und Selbstbestimmung. Das Gehirn ist von einem massiven Schädel umgeben und durch die Blut-Hirn-Schranke von den meisten systemischen Behandlungen getrennt (Steeg et al., 2011). Deshalb wird die Behandlung von Glioblastomen und Gehirnmetastasen noch lange Zeit eine große Herausforderung in der Therapie von Krebserkrankungen bleiben. Es ist unschwer zu erkennen, dass die aktuell verfügbaren Therapiemethoden keine vollständige Heilung ermöglichen werden. Neuartige Diagnostik- und Behandlungsmethoden werden dringend benötigt, um Patienten mit diesen schweren Erkrankungen eine Perspektive zu bieten, die über eine palliative Behandlung hinaus geht.

## **1.2 Diagnostik von Hirntumoren und die stereotaktische Biopsie**

Typische Symptome von Tumorerkrankungen des Gehirns sind Hirndrucksymptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, visuelle Störungen sowie Schwindel und Verwirrtheit. Durch die Raumforderungen können je nach betroffener Region Sprachstörungen und weitere neurologische Defizite, Persönlichkeitsstörungen, epileptische Anfälle und Gleichgewichtsstörungen auftreten (Preusser et al., 2011; Preusser et al., 2012a). Liegt nach einer neurologischen Untersuchung durch einen Arzt der Verdacht auf einen Hirntumor vor, wird in der Regel eine Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT, auch MRI) oder eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) durchgeführt. Ein Glioblastom zeigt sich in der Regel als ringförmige Kontrastmittelverstärkung in der Bildgebung. Eine genauere Bestimmung des Tumors, bzw. der Ausschluss anderer Ursachen wie einem Hirnabszess oder Hirninfarkt erfordert eine Gewebeprobe.

Neben einer offenen Operation zur Gewinnung einer Probe aus dem Tumor, ist es möglich mittels einer seriellen stereotaktischen Biopsie Gewebe zu entnehmen (Reithmeier et al., 2013). Bei dieser operativen Technik wird auf der Basis der zuvor durchgeführten Bildgebung (in der Regel MRT oder PET) eine softwaregestützte dreidimensionale Planung für eine Trajektorie vom Schädelrand bis zum Tumor durchgeführt. Über ein kleines Bohrloch (von etwa 2 mm Durchmesser) im Schädel führt ein Neurochirurg nun eine Hohlnadel ins Gehirn des Patienten ein. Mit einer Biopsienadel kann der Chirurg nun Gewebeproben entnehmen, die direkt im Operationssaal von einem anwesenden Neuropathologen mittels eines Austrichpräparats beurteilt werden. Bei positiver Rückmeldung des Neuropathologen, dass sich die Position der Nadel im Tumor befindet, werden weitere Proben für die histologische und molekularbiologische Untersuchung entnommen. Eine histologische Untersuchung ist unerlässlich für die Diagnosestellung eines Glioblastoms. Neben der Histologie hat auch die molekularbiologische Untersuchung in den letzten Jahren stark an Relevanz gewonnen und wird mit zunehmender Bedeutung der personalisierten Medizin in der

Zukunft eine immer wichtigere Rolle spielen. In der Neuropathologie werden derzeit folgende Marker in der Glioblastomdiagnostik routinemäßig untersucht:

1. Methylierung des MGMT-Promotors (Nachweis über eine Methylierungs-spezifische PCR)

Das Gen von *MGMT* kodiert für die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, welche Alkylgruppen von Guanin entfernt. Eine Hypermethylierung des Promotors ist ein prädiktiver Marker für ein besseres Ansprechen auf alkylierende Chemotherapeutika wie Temozolomid. Weiterhin ist eine Hypermethylierung ein prognostischer Marker, der eine längere Gesamtüberlebenszeit indiziert (Hegi et al., 2005).

2. Verlust der Heterozygotie (LOH) 1p/19q (Nachweis durch Mikrosatelliten-PCR-Analyse)

LOH 1p/19q ist ein prognostischer Marker für eine längere mittlere Überlebenszeit sowie ein prädiktiver Marker für ein günstigeres Ansprechen auf Bestrahlung und Chemotherapie (Ohgaki & Kleihues, 2013b).

3. *IDH1/2*-Mutationen (Nachweis durch Pyrosequenzierung)

*IDH1*-Mutationen sind ein prognostischer Marker für eine deutlich längere mittlere Überlebenszeit (27,1 Monate im Vergleich zu 11,3 Monaten) und sind stark mit sekundären Glioblastomen assoziiert (Ohgaki & Kleihues, 2013a). Sekundäre Glioblastome sind historisch durch den Befund einer vorherigen Diagnose eines niedriggradigen Astrozytoms definiert. Sie haben meist einen deutlich günstigeren Verlauf als primäre Glioblastome, sind histologisch jedoch nicht von diesen unterscheidbar.

Weitere häufig untersuchte Marker zur Unterscheidung von primären und sekundären Glioblastomen sind *TP53*-Mutationen (typisch für primäre Glioblastome), *EGFR*-Amplifikationen (epidermal growth factor receptor) und *PTEN*-Deletionen (phosphatase and tensin homolog).

Am Zentrum für Neuropathologie in München werden jährlich etwa 400 stereotaktische Gewebeproben beurteilt. Bei über 80% der Gliome, die im Klinikum der LMU München diagnostiziert werden, wird eine individuelle Therapieplanung nicht zuletzt anhand der Gewebeproben der stereotaktischen Biopsie vorgenommen.

### 1.3 Die Blut-Hirn-Schranke

Das menschliche Gehirn wird von etwa 100 Milliarden Kapillaren mit Sauerstoff versorgt. Das gesamte Blutgefäßsystem hat einen Volumenanteil zwischen 7 und 10 Prozent des Gehirns (Fagerholm, 2007). Das Blutgefäßsystem des Gehirns weist im Vergleich mit anderen Organen eine Besonderheit auf: die Blut-Hirn-Schranke. Endothelzellen, die Basalmembran, Perizyten, Astrozyten und Mikroglia bilden die Blut-Hirn-Schranke. Das wichtigste Element der Blut-Hirn-Schranke sind die Endothelzellen, die über Verschlusskontakte und Adhäsionsverbindungen fest miteinander verknüpft sind und keine großen Moleküle aus den Blutgefäßen passieren lassen (Zlokovic, 2008). Eine intakte Bedeckung der Blutgefäße mit Perizyten ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke (Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010). Die Blut-Hirn-Schranke verhindert das Austreten von Blutplasmakomponenten und Leukozyten ins Gehirn, schützt das Gehirn vor Umwelteinflüssen und stabilisiert das Mikromilieu des Gehirns. Ionen, Proteine, Peptide und Nährstoffe können spezifisch durch Transportsysteme über die Blut-

Hirn-Schranke ins Gehirn geliefert werden. Über 98% aller niedermolekularen Medikamente, sowie alle therapeutischen Peptide, Proteine und genetischen Vektoren können die Blut-Hirn-Schranke nicht passiv überwinden (Zlokovic, 2008). Lediglich einige kleine (weniger als 400 Dalton), lipophile Moleküle mit weniger als 9 Wasserstoffbrückenbindungen können die Blut-Hirn-Schranke passiv überwinden (Zlokovic, 2008). Die Blut-Hirn-Schranke stellt ein Hindernis für die Therapie sämtlicher, das Gehirn betreffender Erkrankungen dar.

#### **1.4 Behandlung von malignen Gehirntumoren**

Glioblastome und Gehirnmastasen sind besonders verheerend, da häufig die Lebensqualität der Patienten durch fortschreitende neurologische Ausfälle beeinträchtigt wird. Von Einzelfällen abgesehen, sind Glioblastome und Gehirnmastasen unheilbar, eine Behandlung hat derzeit nur eine lebensverlängernde oder palliative Zielsetzung.

Glioblastome werden zunächst durch chirurgische Resektion möglichst vollständig entfernt, sofern es die Lage im Gehirn zulässt. Eine Fluoreszenzdarstellung nach oraler Verabreichung von 5-Aminolävulinsäure ermöglicht eine vollständigere chirurgische Resektion (Stummer et al., 2006). Dennoch ist eine komplette Entfernung aller Tumorzellen unmöglich, da Glioblastome ein diffuses und infiltratives Wachstum aufweisen und immer einzelne Tumorzellen im umgebenden gesunden Gewebe zurückbleiben. Die Gefahr eines neurologischen Schadens bei einer Resektion oder Bestrahlung beschränkt deshalb die Effektivität dieser Eingriffe. Letztendlich führen diese verbleibenden Zellen zum Rezidiv. Nach der chirurgischen Resektion ist derzeit eine Kombination aus Radiotherapie und Chemotherapie mit Temozolomid (alkylierendes Zytostatikum) der Behandlungsstandard (Preusser et al., 2011). Dabei ist der Verlauf für Patienten mit methylierten MGMT-Promotor günstiger als bei Patienten mit unmethyliertem MGMT-Promoter (Hegi et al., 2005). Möglichkeiten, weitere chemotherapeutische Behandlungen zu wählen, sind durch die Blut-Hirn-Schranke stark limitiert, da viele Substanzen diese nicht passieren können. Neben der primären Strategie das Tumorstadium zu beschränken, müssen häufig Symptome und Komplikationen adressiert werden (Sizoo et al., 2010). Letztlich versterben Patienten trotz maximaler Behandlung nach dem Auftreten des Rezidivs, das in der Regel schlechter auf eine Behandlung anspricht und nicht mehr chirurgisch entfernt werden kann.

Patienten mit Gehirnmastasen sind eine heterogene Gruppe, insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Primärtumore, aber auch die Anzahl, Größe und Lage der Mastasen betreffend (Kienast & Winkler, 2010). Für jeden Patienten wird deshalb die Therapie individuell geplant. Behandlungsoptionen umfassen Ganzhirnbestrahlung, Radiochirurgie, chirurgische Resektion und systemische Behandlungen mit Chemotherapie oder spezifischeren Therapeutika (Soffietti et al., 2008). Eine Ganzhirnbestrahlung (Ellis et al., 2012) wird bei multiplen Mastasen angewendet. Eine chirurgische Resektion wird in der Regel durchgeführt, wenn es sich um eine oder zwei chirurgisch erreichbare Mastasen handelt und der Primärtumor unter Kontrolle ist. Bei nicht operablen Mastasen oder Patienten die nicht operiert werden können, kann alternativ auch eine stereotaktische Radiochirurgie durchgeführt werden. Die Behandlung mit Zytostatika zeigte in klinischen Studien bisher keinen Vorteil für die Gesamtüberlebenszeit.

Es wird davon ausgegangen, dass die Blut-Hirn-Schranke bei kleinen Metastasen die Penetration vieler gebräuchlicher Zytostatika verhindert. Die Blut-Hirn-Schranke ist jedoch in der Regel ab einer Tumorgöße von 0,5 mm beeinträchtigt, weshalb sich bestimmte Chemotherapien für individuelle Behandlungen eignen. Insbesondere auf Agenzien mit guter Blut-Hirn-Schranken-Penetration wie Temozolomid oder Irinotecan werden derzeit Hoffnungen in der klinischen Forschung gesetzt (Preusser et al., 2012b). Eine präklinische Studie beschreibt eine starke intratumorale Heterogenität in der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei Gehirnmastasen im Mausmodell (Lockman et al., 2010). Bestimmte Teile einer Metastase könnten also besser auf eine Behandlung ansprechen als andere Regionen.

### 1.5 Tumorangiogenese

Solide Tumore sind ab einer Größe von wenigen Millimetern auf die Tumorangiogenese angewiesen, um ihr Wachstum und die Versorgung mit Nährstoffen aufrecht zu erhalten (Weis & Cheresch, 2011). Bereits vor über 40 Jahren wurde vorgeschlagen, die Inhibition der Tumorangiogenese als Strategie zur Tumorthherapie zu verwenden (Folkman, 1971). Dazu mussten jedoch die zunächst unbekannten angiogenen Faktoren identifiziert und entsprechende Inhibitoren dieser Faktoren entdeckt werden.

Die Neubildung von Blutgefäßen wird als Neovaskularisation bezeichnet und schließt die Vaskulogenese und die Angiogenese ein (Abb. 1). Häufig werden alle Aspekte der Neovaskularisation als Angiogenese bezeichnet. Angiogenese im striktesten Sinn beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße durch die Proliferation bereits existierender Endothelzellen (Potente et al., 2011). Neben der Entwicklung spielt die Angiogenese bei der Wundheilung und Reproduktion, aber auch beim Wachstum solider Tumoren eine wichtige Rolle.

Unter Vaskulogenese versteht man die Bildung neuer Endothelzellen aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) zur Bildung von Blutgefäßen. Die Vaskulogenese spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Embryos. Es gibt auch Hinweise darauf, dass die Vaskulogenese auch in Tumoren eine Rolle spielt (Lyden et al., 2001) und Tumore Endothelzellen mit Vorläufern aus dem Knochenmark rekrutieren können.

Die meisten Gefäßneubildungen bei der Angiogenese fallen unter die Bezeichnung der sprossenden Angiogenese. Dabei wird eine Endothelzelle durch proangiogene Faktoren motil, invasiv und bildet Filopodien aus (Abb. 2). Diese Zelle wird als motile Terminalzelle bezeichnet und bewegt sich in Richtung der angiogenen Faktoren. Benachbarte Endothelzellen folgen dieser, proliferieren, bilden ein neues Gefäßlumen und rekrutieren perivaskuläre Zellen zur Stabilisierung (Potente et al., 2011).

Daneben existiert noch die spaltende Angiogenese (Intussuszeption), bei der ein existierendes Gefäß durch eine Einstülpung der Gefäßwand in zwei kleinere Gefäße getrennt wird.

Es wurde ebenfalls beschrieben, dass Tumorzellen in der Lage sind wie Endothelzellen Gefäßlumen zu bilden (Maniotis et al., 1999), allerdings ist dieses Konzept, das als Vaskuläre Mimikry bezeichnet wird, umstritten (Weis & Cheresch, 2011). Weiterhin wurde für Krebsstammzellen verschiedener Tumore, darunter auch Glioblastomstammzellen beschrieben, dass diese in



Endothelzellen ausdifferenzieren können (Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010). Hierbei ist jedoch die biologische und therapeutische Relevanz fraglich, da dieser Effekt nur für einen sehr geringen Prozentsatz der Endothelzellen beobachtet wird.

Tumorzellen können außerdem entlang bereits existierender Gefäße wachsen, man bezeichnet dies als Gefäß-Kooption, hierbei handelt es vielmehr um eine Überlebensstrategie der Tumorzellen als um einen angiogenen Prozess.

Die sprossende Angiogenese ist der wichtigste Aspekt bei der Tumorangiogenese, allerdings sollten auch andere Mechanismen nicht außer Acht gelassen werden. Obwohl diese zwar zunächst anteilig eher unbedeutend sind, können diese jedoch während einer antiangiogenen Therapie theoretisch als alternativer Wirkungsmechanismus an Bedeutung gewinnen.

Der erste beschriebene, derzeit therapeutisch bedeutendste angiogene Faktor ist VEGF-A (engl. vascular endothelial growth factor A), kurz VEGF, dessen wichtigster Mediator endothelialer Zellen der VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2) ist (Bagri et al. 2010).

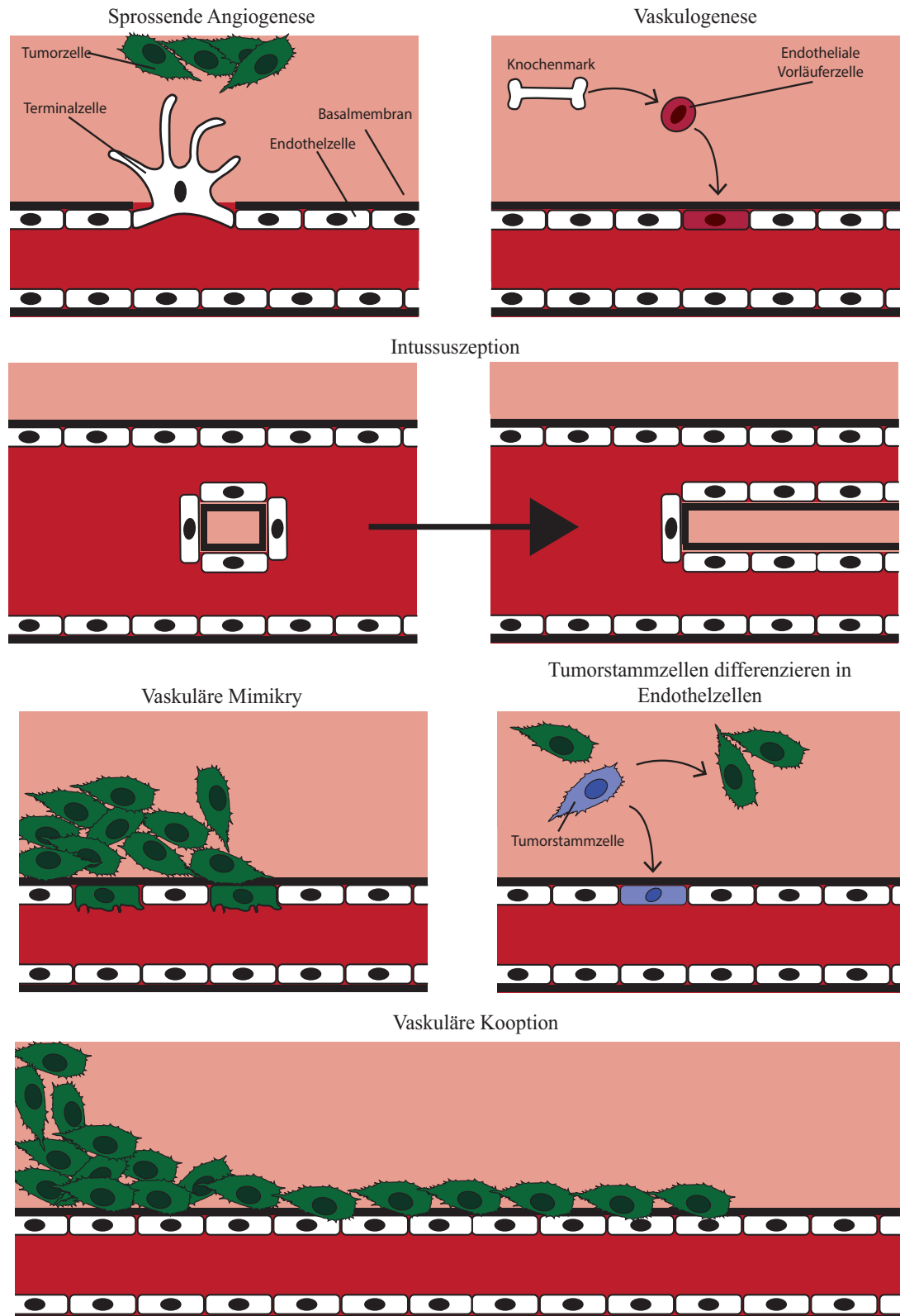
VEGF wird von Zellen produziert, denen nicht ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht. Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird vom Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible factor (HIF) registriert, der aus einer instabilen Alpha-Untereinheit (z.B.: HIF1 $\alpha$ ) und einer stabilen Beta-Untereinheit (z.B.: HIF1 $\beta$ ) besteht. Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird HIF $\alpha$  von Prolyl-Hydroxylase-Domäne-Proteinen (PHD) hydroxyliert und in der Folge vom Ubiquitinligase Komplex ubiquitiniert und proteasomal degradiert (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Unter niedrigen Sauerstoffbedingungen ist die Aktivität der PHD-Proteine stark reduziert, HIF $\alpha$  kann in der Zelle akkumulieren, mit HIF1 $\beta$  dimerisieren und im Kern zwischen 100 und 200 verschiedene Gene aktivieren, darunter auch VEGF (Kaelin & Ratcliffe, 2008). Die Produktion von VEGF kann in Tumoren über eine Reihe von epigenetischen Mechanismen oder Mutationen in Signalpfaden oberhalb von VEGF verstärkt werden. In der Tat erlangen viele solide Tumore in der Regel die Fähigkeit zur erhöhten Expression von VEGF (Goel et al., 2011).

In der Familie der VEGF-Proteine existieren neben VEGF-A noch VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und der Placenta Growth Factor (PlGF) (L. Ellis & Hicklin, 2008). VEGF-A wird durch alternatives Spleißen in fünf verschiedenen Isoformen produziert, die vorherrschende Isoform besteht aus 165 Aminosäuren (Ellis & Hicklin, 2008). Die Proteine der VEGF-Familie binden an die drei Rezeptortyrosinkinasen VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3, sowie an die Neuropiline NRP-1 und NRP-2, die unter anderem als Korezeptoren für die VEGF-Rezeptoren fungieren. In adultem Gewebe ist die Expression von VEGFR3 hauptsächlich auf Lymphgefäße beschränkt, vor allem VEGF-C und VEGF-D sind hierbei relevant (Potente et al., 2011).

VEGFR2 wird ausschließlich von Endothelzellen exprimiert und hat eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung von motilen Terminalzellen bei der sprossenden Angiogenese (Abb. 2).

Die Induktion von motilen Terminalzellen und deren Bildung von Filopodien wird durch die Bindung von VEGF-A an VEGFR2 induziert. Terminalzellen exprimieren daraufhin den Delta like ligand (DLL4), der benachbarten Endothelzellen über den Notch-Rezeptor signalisiert (Eilken & Adams, 2010), die Expression von VEGFR2 und DLL4 ihrerseits zu reduzieren, die Expression von VEGFR1 aber zu erhöhen (Potente et al., 2011). VEGFR1 wird vor allem





**Abbildung 1: Formen der Tumorangiogenese**

Der Großteil der Tumorangiogenese fällt unter die sprossende Angiogenese. Vaskulogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Organismen. Die Intussuszeption tritt bei größeren Gefäßen auf. Die Relevanz von vaskulärer Mimikry und Tumorstammzellumdifferenzierung wird kontrovers diskutiert. In Ermangelung tatsächlicher Blutgefäßveränderungen können Tumorzellen bei der vaskulären Kooptation lediglich entlang bereits existierender Gefäße wachsen. (Nach Jain & Carmeliet, 2012)

von benachbarten Endothelzellen exprimiert und verhindert die Umwandlung zur motilen Terminalzelle. Mit Hilfe dieser negativen Rückkopplung von VEGF/VEGFR2 und Notch/DLL4 regulieren Endothelzellen den dynamischen Wechsel der führenden Terminalzelle und den ersten Schritt der angiogenen Kaskade (Potente et al., 2011).

VEGFR1 wird auch von nicht-Endothelzellen exprimiert, beispielsweise von Monozyten und Makrophagen (Olsson et al., 2006). Die Bedeutung von VEGF für die Angiogenese ist essentiell. Bereits die heterozygote Inaktivierung eines *Vegf*-Allels führt zu schweren Defekten in der Entwicklung von Mäuseembryos und ist pränatal letal zwischen Tag 11 und 12 der Entwicklung (Ferrara et al., 1996). Eine homozygote Deletion aller *Vegfr*-Gene ist ebenfalls embryonal letal.

Eine weiteres Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalsystem spezifisch für Endothelzellen ist das Angiopoietin/TIE (Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains) Signalsystem (Augustin et al., 2009). Die Signaltransduktion über die TIE-Rezeptoren erhält die Gefäßhomöostase in adultem Gewebe und reguliert die späteren Schritte der angiogenen Kaskade (Augustin et al., 2009). Es sind zwei TIE-Rezeptoren bekannt, TIE1 und TIE2.

In Mausmodellen ist die Deletion von *Tie1* oder *Tie2* bereits embryonal letal. (Augustin et al., 2009). Es sind vier Angiopoietine als Liganden von TIE2 bekannt: ANG-1, ANG-2, ANG-3 und ANG-4, jedoch keine für TIE1. Angiopoietine sind etwa 70 kDa große Glykoproteine, die über eine zentrale coiled-coil Domäne Dimere, Trimere und Tetramere bilden können (Fagiani & Christofori, 2013). ANG-1 aktiviert den TIE2-Rezeptor. Eine Deletion von ANG-1 ist eine Phänokopie der letalen TIE2-Deletion. ANG-1 wird von einer Vielzahl von Zelltypen gebildet, darunter Perizyten, glatten Muskelzellen der Gefäße und Monozyten. Die Phosphorylierung von TIE2 bei ANG-1-Bindung stabilisiert bereits bestehende Blutgefäße, indem intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die das Überleben von Endothelzellen sichern und Apoptose inhibieren (Fagiani & Christofori, 2013).

ANG-2 dagegen ist wahrscheinlich ein Antagonist von TIE2. ANG-2 defiziente Tiere sind lebensfähig, entwickeln jedoch bleibende vaskuläre und lymphatische Defekte (Gale et al., 2002). Die Überexpression von ANG-2 ist dagegen letal (Hu & Cheng, 2009). ANG-2 wird nicht von Tumorzellen, sondern hauptsächlich von Endothelzellen produziert. ANG-2 wird in Granula gelagert, den Weibel-Palade-Körperchen und wirkt bei Freisetzung autokrin, destabilisiert Blutgefäße und Perizyten und erleichtert die Wirkung anderer angiogener Faktoren (Felcht et al., 2012). ANG-2 wird bei angiogener Aktivierung von Endothelzellen stark hochreguliert. Die genauen Wirkungsweisen von ANG-2 sind noch nicht aufgeklärt, erschwert durch die kontextuellen Unterschiede in Gegenwart von ANG-1 und anderen angiogenen Faktoren. Beispielsweise kann ANG-2 bei Anwesenheit von VEGF die Angiogenese fördern, während es in Abwesenheit von VEGF zur Rückbildung von Gefäßen führt. Kürzlich wurde beschrieben, dass ANG-2 neben TIE2 auch mit geringerer Affinität an bestimmte Integrine binden kann. Diese werden insbesondere von Terminalzellen hochreguliert, während gleichzeitig TIE2 herunterreguliert wird (Felcht et al., 2012). Die Signaltransduktion findet über alternative Phosphorylierung von FAK (engl.: focal adhesion kinase) statt und erklärt den differentiellen Phänotyp der ANG-2-Inhibition auf Terminalzellen (Felcht et al., 2012). Es gibt aber auch Studien, die Effekte durch

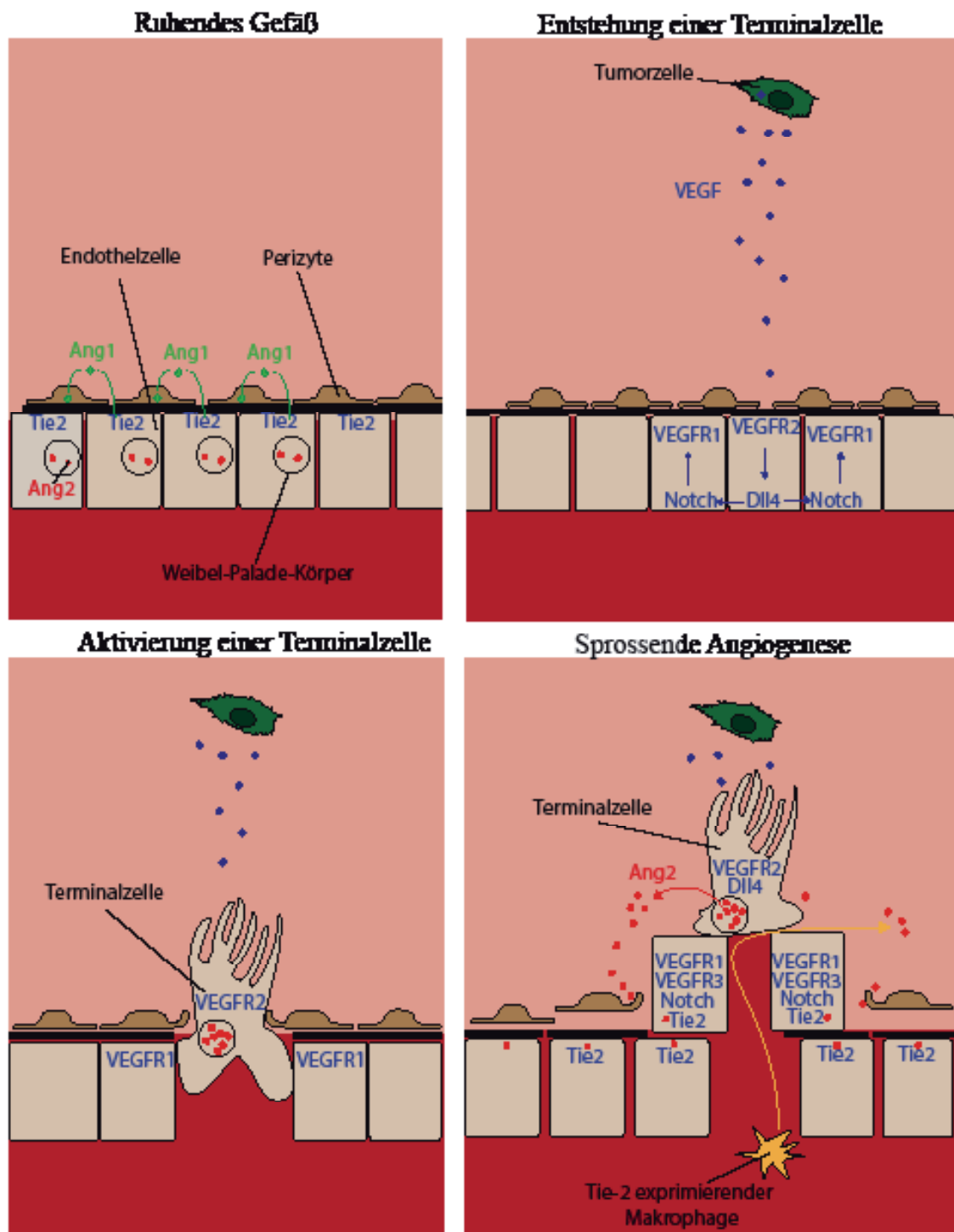


Abbildung 2: VEGF und Angiopoietin-2 bei der sprössenden Angiogenese

Im ruhenden Gefäß wird Angiopoietin-1 von Perizyten sezerniert und bindet an den TIE2-Rezeptor der Endothelzellen, Angiopoietin-2 ist in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Die meisten Tumorzellen überexprimieren VEGF, jedoch nur selten Angiopoietin-2. VEGF aktiviert den VEGFR2-Rezeptor und induziert die Expression von Dll4, das den Notch Rezeptor in benachbarten Endothelzellen aktiviert. Nachbarzellen reduzieren die VEGFR2-Expression und erhöhen die VEGFR1-Expression. Auf diese Weise wird die Terminalzelle bestimmt. Die Terminalzelle wird motil und bewegt sich in Richtung der angiogenen Signale. Angiogene Aktivierung und Hypoxie führen zur einer verstärkten Produktion von Angiopoietin-2. Der Terminalzelle folgen benachbarte Endothelzellen, die proliferieren und einen neuen Gefäßarm bilden. Die Tie-2 Expression in der Terminalzelle sinkt. Die Terminalzelle sezerniert Ang-2, das an TIE2 Rezeptoren der Endothelzellen bindet. Zellverbindungen und Perizytenbedeckung lockern sich. TIE2-positive Makrophagen werden angelockt.

ANG-2-Inhibition auf eine reduzierte TIE2-Aktivität zurückführen (Daly et al., 2013).

Es existiert eine Vielzahl von weiteren angiogenen Faktoren, darunter der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) oder der Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Durch die Beteiligung einer Vielzahl von Chemokinen, Rezeptoren, Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren kann das Blutgefäßwachstum durch Manipulationen auf verschiedensten Ebenen beeinflusst werden (Weis & Cheresch, 2011). Unspezifischere Inhibitionen können jedoch eine Vielzahl von Nebeneffekten bewirken, wie es z.B. bei Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen vorkommt. Inhibitoren von VEGF und Angiopoietin-2 haben dagegen als pharmakologisches Angriffsziel das Potential, auch in Patienten eine starke antiangiogene Wirkung mit vergleichsweise geringen unspezifischen Nebenwirkungen zu erzielen.

## **1.6 Antiangiogene Therapien und vaskuläre Normalisierung**

Bevacizumab (Avastin) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper der VEGF bindet. Während in präklinischen Tumormodellen die Inhibition von VEGF vielversprechende Ergebnisse zeigte (Kim et al., 1993), blieben die Ergebnisse von Bevacizumab als Monotherapie in klinischen Studien gering (Jain, et al., 2006). In der Kombination mit einer Chemotherapie dagegen zeigte die Addition von Bevacizumab in klinischen Studien signifikante Verbesserungen in der progressionsfreien Überlebenszeit und der Gesamtüberlebenszeit. In Verbindung mit Chemotherapie ist Bevacizumab für die Therapie des metastasierenden Kolonkarzinoms (Hurwitz & Fehrenbacher, 2004), rezidiviertem oder metastasierenden nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Sandler et al., 2006), Eierstockkrebs (Burger et al., 2011) sowie in Kombination mit Interferon  $\alpha$ -2a beim Nierenzellkarzinom zugelassen. In Europa besteht weiterhin die Zulassung beim metastasierenden Mammakarzinom in Kombination mit Chemotherapie (Miller et al., 2007), während in der USA diese wegen mäßigen Nutzen bei häufigen Nebenwirkungen wieder zurückgezogen wurde. In den USA ist Bevacizumab als Monotherapie für das rezidivierte Glioblastom zugelassen (Norden et al., 2009). Da die Grundlage hierfür nur eine einarmige Phase-II Studie war, ist bisher keine Zulassung in der Europäischen Union erfolgt. Kürzlich erfolgte die Bekanntgabe der Ergebnisse der Phase-III-Studien für die Behandlung von neu diagnostiziertem Glioblastom mit Bevacizumab und Radiochemotherapie (AVAGLIO und RTOG 0825). In beiden Studien wurde keine verbesserte Gesamtüberlebensdauer beobachtet. In der Studie AVAGLIO wurde eine verlängerte progressionsfreie Überlebensdauer beobachtet, während in der Studie RTOG 0825 keine signifikanten Unterschiede beschrieben wurden. In einer präklinischen Studie konnte gezeigt werden, dass Bevacizumab die Anzahl der Gehirnmastasen verringern kann (Kienast et al., 2010).

Neben VEGF-A als pharmakologisches Angriffsziel, existieren auch weitere Inhibitoren unterschiedlicher Ziele, darunter VEGF Rezeptor 2, Placenta Growth Factor (PlGF), Integrine, und Angiopoietin-2.

Präklinische Daten haben Angiopoietin-2 als weiteres vielversprechendes Ziel zur Inhibition der Tumorangiogenese hervorgehoben, da die Expression von Angiopoietin-2 in gesundem Gewebe nur sehr gering ist (Gerald et al., 2013). Die Überexpression von Angiopoietin-2 in

Gliomzellen der Maus beeinträchtigt eine Therapie gegen VEGFR2 (Chae et al., 2010). Die Inhibition von Angiopoietin-2 zeigte als Monotherapie und in Kombination mit Bevacizumab oder Chemotherapie in subkutanen Mausmodellen mit Kolonkarzinom- oder Melanomzelllinien antitumorale und antiangiogene Aktivität (H. Huang et al., 2011). Eine humanisierte Version dieses Antikörpers (PF04856884 oder CVX-060) befindet sich inzwischen in einer klinischen Studie der Phase II für Nierenzellkarzinome (Gerald et al., 2013). Ein chimärer Antikörper (double anti-angiogenic protein: DAAP) der VEGF-A und Angiopoietine bindet, inhibiert Tumorangiogenese und Metastasierung in subkutanen Mausmodelle von Melanom- und Lungenkarzinomzellen und orthotopen Mausmodellen von Kolonkarzinom- und Eierstockkrebszelllinien (Koh et al., 2010). Es befinden sich derzeit mehrere Antikörper oder Peptibodies, die Angiopoietin-2 inhibieren, in klinischen Studien der ersten und zweiten Phase (Cascone & Heymach, 2012). AMG 386 (Trebananib), ein Peptibody gegen Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 befindet sich in einer Phase-III Studie in Kombination mit Chemotherapie bei Eierstockkrebs. Regorafenib (Stiverga) ist ein Multikinaseinhibitor der auch VEGFR und TIE2 inhibiert und für das metastasierende Kolonkarzinom zugelassen ist, allerdings ist der Beitrag der TIE2 Inhibition eher gering (Gerald et al., 2013). Das größte Potential, basierend auf präklinischen Daten, besteht in der Inhibition von Angiopoietin-2 gemeinsam mit VEGF (Daly et al., 2013).

Antiangiogene Behandlungen in Tumoren des Gehirns stellen einen Sonderfall dar, da die pathologischen Tumorgefäße im Gehirn in der Regel funktionell stark verändert sind und deshalb die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr intakt ist (Tong et al., 2004). Inwiefern und in welchen Konzentrationen antiangiogene Behandlungen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke wiederherstellen können und welche Auswirkungen dies auf Diagnostik und Therapie von Gehirntumoren hat, ist Teil der aktuellen Forschung in diesem Gebiet und wird kontrovers diskutiert.

Die Resultate der ersten klinische Studien mit antiangiogenen Therapien waren unerwartet: Der Nutzen antiangiogener Monotherapien war gering, dennoch verstärkte die antiangiogene Therapie in Kombination den Nutzen von chemotherapeutischen Behandlungen.

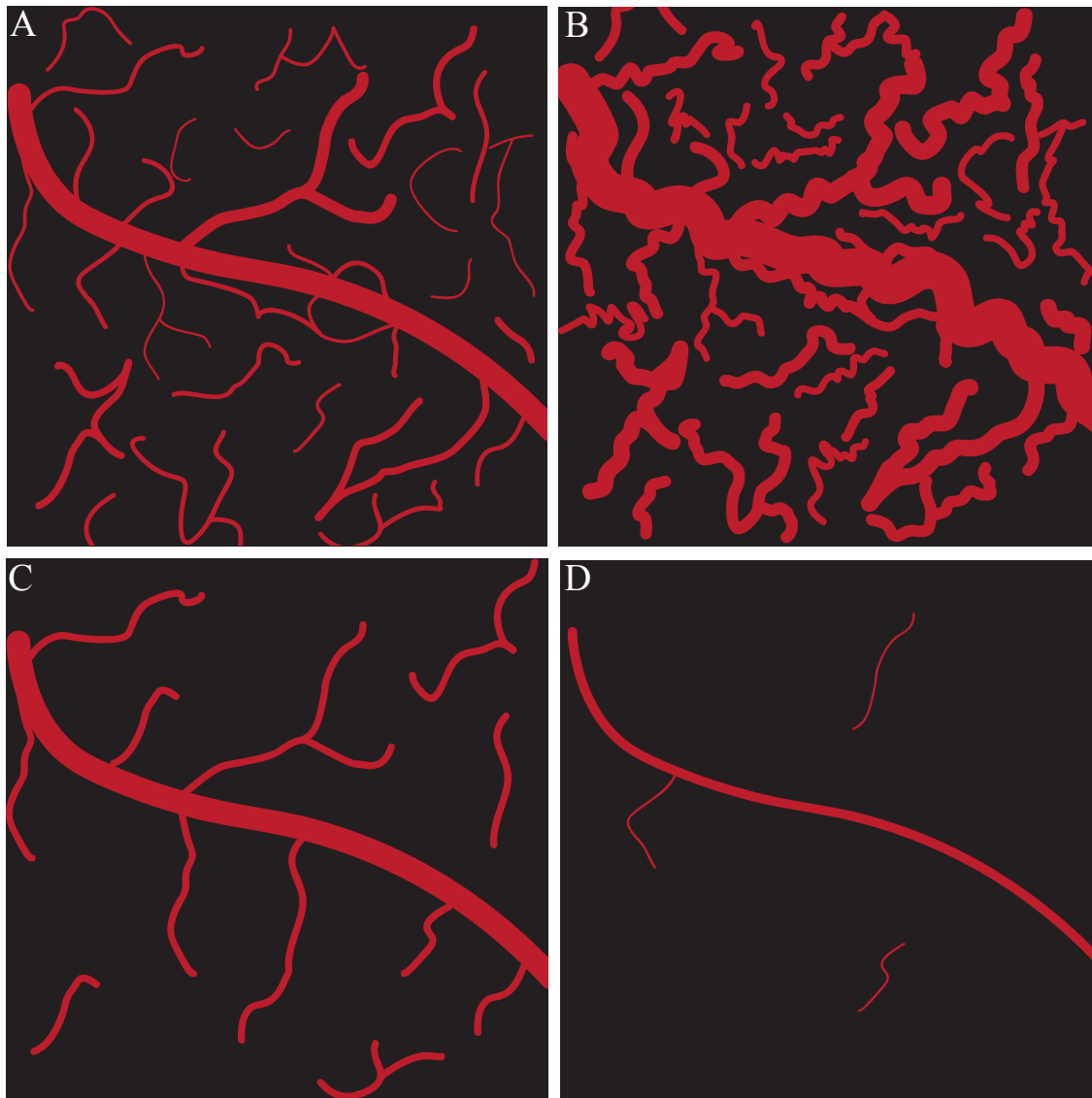
Zur Erklärung dieser Effekte wird die Hypothese der „Vaskulären Normalisierung“ herangezogen (Abb. 3) (Goel et al., 2011; Jain, 2001; Jain, 2005; Jain & Carmeliet, 2012). Die Normalisierungshypothese schlägt vor, dass eine antiangiogene Behandlung in der richtigen Dosis nicht etwa sämtliche Blutgefäße eines Tumors ausradiert, sondern lediglich die abnormale Struktur und Funktion der Tumorgefäße verändert, sozusagen „normalisiert“.

Das Konzept schlägt vor, dass die Blutgefäße dann eher den Gefäßen in gesundem Gewebe ähneln, mit Auswirkungen auf das Mikromilieu des Tumors. Dieser Effekt entsteht durch einen regelmäßigeren Blutfluss, durch eine homogenere Gefäßdichte, eine reduzierte Permeabilität der Gefäße sowie durch stabilere Endothelzellverbindungen und eine gleichmäßigere Perizytenbedeckung (Goel et al., 2011).

Durch die Gefäßnormalisierung werden weniger Tumorregionen hypoxisch und systemisch applizierte Wirkstoffe gleichmäßiger im Tumor verteilt. Die pharmakologische antiangiogene

Inhibition ist einem empfindlichen Gleichgewicht ausgesetzt, zu hohe Dosen oder eine verlängerte Behandlung kann den antiangiogenen Effekt verstärken und zur Regression der Blutgefäße führen (Tong et al., 2004). Es gibt allerdings auch Studien, die einen gegensätzlichen, hinderlichen Effekt der Gefäßnormalisierung beschreiben. Im Mausmodell verringerte sich etwa die Aufnahme weiterer therapeutischer Antikörper im Tumor nach einer Behandlung mit Bevacizumab (Arjaans et al., 2013).

### 1.8 Mikroglia, Tumor-assoziierte Makrophagen und TIE2-positive Makrophagen



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von gesunden Gefäßen, Tumorangiogenese, vaskulärer Normalisierung und inadäquaten Gefäßen**

A: Gesundes Gehirngewebe: Gleichgewicht der pro- und antiangiogenen Faktoren bewirkt eine hierarchische Organisation der Gefäße, gleichmäßige Verteilung der Kapillaren, intakte Blut-Hirn-Schranke. B: Tumorgefäße eines angiogenen Gehirntumors: Überschuss an angiogenen Faktoren führt zu erweiterten, verlängerten, verdrehten, dysfunktionalen Gefäßen mit chaotischer Organisation, starker regionaler Heterogenität und einer gestörten Blut-Hirn-Schranke mit Ödemen durch eine hohe Gefäßpermeabilität. C: Normalisierte Tumorgefäße: Überschuss an angiogenen Faktoren wird durch Antikörper teilweise kompensiert: Gefäßdurchmesser, Organisation und Länge ähneln Gefäßen in gesundem Gewebe. Eine gleichmäßigere Durchblutung des Tumors und reduzierte Ödeme durch verringerte Gefäßpermeabilität können theoretisch die Wirksamkeit einer Chemotherapie oder Bestrahlung verstärken. D: Inadäquate Gefäße nach starker antiangiogener Behandlung: Mangel an angiogenen Signalen führt zur Gefäßregression und einer verringerten Durchblutung des Tumors. Dieser Zustand ist in der Regel als Monotherapie zur Behandlung von Tumoren ineffizient und zeigte in klinischen Studien nur geringe Wirksamkeit.



Mikroglia stellen die Makrophagen des Gehirns dar. Mikroglia wandern während der Embryonalentwicklung von Mäusen zwischen Tag 10 und 19 aus dem Dottersack ins Gehirn und nehmen dort ihre typische Gestalt an, die sich von klassischen, amöboiden Makrophagen unterscheidet: Einen kleinen Zellkörper mit vielen verästelten zellulären Prozessen, die ihr eigenes Territorium von etwa 50 µm Durchmesser bedecken (Kettenmann et al., 2011, Goel et al., 2011). Diesem Ruhezustand wurde lange Zeit keine besondere Bedeutung zugeschrieben, bis entdeckt wurde, dass Mikroglia jederzeit mit diesen feinen Prozessen ihre Umgebung abtasten (Nimmerjahn et al., 2005). Inzwischen geht man davon aus, dass Mikroglia unter anderem eine wichtige Rolle bei der Bildung von Synapsen und bei einer Vielzahl von Erkrankungen spielen (Kettenmann et al., 2013). Mikroglia werden durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert und können eine aktivierte, amöboide Form annehmen. Unter pathologischen Bedingungen, etwa einer Gehirnblutung oder einem Tumor, können auch Monozyten mit Ursprung aus dem Knochenmark als periphere Makrophagen über die Blutgefäße ins Gehirn austreten. Im gesunden Gehirn sind jedoch ausschließlich Mikroglia zu finden, die eine stabile Population bilden und etwa 10% der Zellen des Gehirns ausmachen (Charleset et al., 2011, Aguzzi et al., 2013).

Aktivierte Makrophagen in soliden Tumoren werden als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet. Einige Studien legen nahe, dass die Anzahl von TAM mit einer schlechten Prognose und der Malignität des Tumors korreliert (Huang et al., 2011b).

In Gehirntumoren bestehen TAM aus zwei Populationen unterschiedlichen Ursprungs: Mikroglia und periphere Makrophagen. Morphologisch können die beiden Populationen nicht voneinander unterschieden werden, es ist jedoch teilweise möglich über die Expression von Markerproteinen eine Unterscheidung vorzunehmen. Ist experimentell keine solche Unterscheidung möglich, werden die TAM in Gehirntumoren neutral als Mikroglia/Makrophagen bezeichnet. Eine mögliche Unterscheidung ist CD11b/c positive Mikroglia/Makrophagen von CD11b/c negativen Lymphozyten zu trennen. In dieser Population zeigen nun Mikroglia eine schwache Expression von CD45, während Makrophagen eine starke CD45 Expression aufzeigen. Solide Tumore im Gehirn können zwischen 5 und 20% aus TAMs bestehen (Watters et al., 2005). Makrophagen wie auch Mikroglia können durch eine Vielzahl von Signalen aktiviert und polarisiert werden. Die klassische Form der Aktivierung wird als M1 bezeichnet und beispielsweise durch Interferon-gamma oder bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide induziert. M1-aktivierte Makrophagen produzieren eine pro-inflammatorische Umgebung und besitzen antimikrobielle und antitumorale Aktivität (Li & Graeber, 2012). In Tumoren können Makrophagen jedoch eine alternative M2-Polarisierung annehmen. Tumorzellen tragen aktiv zu dieser Polarisierung bei, indem sie Zytokine wie den Monozytenkolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF), Transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oder die Interleukine 4, 10 und 13 ausschütten (Li & Graeber, 2012). M2-Makrophagen haben immunsuppressive Eigenschaften, verringerte phagozytische Fähigkeiten und begünstigen das Tumorwachstum. In Patienten mit Lungenkarzinomen wurde beispielsweise ein Verhältnis von M1 zu M2 Makrophagen von 30% zu 70% beobachtet (Ma et al., 2010). In Gliomen können M2-Mikroglia durch Chemokine Tumorwachstum, Tumorangiogenese (z.B. durch VEGF), und Invasion (z.B. durch die Matrixmetalloprotease 2) unterstützen (Li &

Graeber, 2012).

Es gibt neue Erkenntnisse, die darauf hindeuten, dass die Polarisierung von Makrophagen eine wichtige Rolle für die Normalisierung von Blutgefäßen spielt (Huang et al., 2011a), (Rolny et al., 2011). Demnach unterstützten immunsuppressive M2 Makrophagen die Bildung abnormaler Tumorgefäße, während immunstimulatorische M1-Makrophagen eine normalisierte Gefäßstruktur fördern.

Außerdem relevant in diesem Zusammenhang ist eine Subpopulation von Makrophagen, die TIE2-exprimierenden Makrophagen (TEM). Die Expression des Angiopoietin-2-Rezeptors TIE2 ist nicht auf Endothelzellen beschränkt. Einige zirkulierende Monozyten exprimieren den TIE2-Rezeptor schwach, regulieren die Expression jedoch nach Ausdifferenzierung in perivaskuläre Makrophagen in Tumoren stark nach oben (De Palma et al., 2005). TEM besitzen ebenfalls eine M2-Polarisierung und tragen wesentlich zur Tumorangiogenese bei, indem sie mit Endothelzellen interagieren. (Mazzieri et al. 2011). Die Expression von Rezeptoren angiogener Signalwege wie TIE2 und NRP1 in Makrophagen deutet bereits auf eine wichtige Rolle der Makrophagen bei der Angiogenese hin. In der Tat konnte die Interaktion von Makrophagen mit Terminalzellen in der Entstehung und Regulation der Blutgefäße des Gehirns bereits gezeigt werden (Fantin et al., 2010).

## **1.7 Mausmodelle von Glioblastomen und Gehirnmetastasen**

Zellkulturexperimente sind in der Regel der erste Schritt in der Entwicklung neuer Medikamente gegen Krebs. Insbesondere bei Gehirntumoren spiegeln in vitro Versuche jedoch in keiner Weise die komplexen Zusammenhänge des Mikromilieus des Gehirns wieder und vernachlässigen Aspekte wie Angiogenese, invasives Wachstum und Metastasierung (Fomchenko & Holland, 2006).

Grundsätzlich existieren verschiedene Ansätze von präklinischen Tumormodellen im Gehirn (Fomchenko & Holland, 2006):

1. Durch Implantationen von Tumorzellen oder Tumorstücken in das Gehirn gesunder Tiere (orthotop). Dabei können humane Zelllinien (z.B. U87) nur in immundefizienten Tiere verwendet werden (Xenotransplantation), syngene Maustumorzelllinien (z.B.: GL261) auch mit immunkompetenten Tieren (Workman et al., 2010).

Vorteile von Implantationen liegen in der Reproduzierbarkeit und schnellen Generation, sowie insbesondere relevant für diese Arbeit, einer relativ guten Kontrolle über die Lage der Entstehung des Tumors. Nachteile liegen im Nichtvorhandensein möglicher Effekte des Immunsystems und einer mangelnden Wiedergabe der Genetik, Biochemie, Histologie und lokalen Unterschiede der Tumore humaner Patienten. Viele Zelllinien verlieren beispielsweise angiogene oder invasive Eigenschaften während der Kultivierung in Zellkultur. Ein wesentliches Hindernis des Transfers von Behandlungserfolgen in präklinischen Modellen auf Tumorkranken sind falsch positive Ergebnisse in Mausmodellen, die aufgrund von Implantationsversuchen generiert werden sind. Insbesondere fragwürdig sind subkutane Implantationen, die nicht das Mikromilieu des Gehirns reflektieren.

2. Durch genetisch veränderte Mausmodelle oder durch virale Injektionen, die lokal Zellen



genetisch verändern (Huse & Holland, 2009). Erfolgreiche genetische Modelle arbeiten mit heterozygoten Deletionen von *Tp53*, *Nf1*, homozygoten Deletionen von *Pten* oder viraler Überexpression von GFAP, RAS, AKT und PDGF-B (Huse & Holland, 2009). Diese Mausmodelle ähneln eher den seltenen Krebsyndromen mit genetischer Prädisposition als spontan entstehenden Tumoren. Diese Modelle können komplexe Zusammenhänge in der Entstehung von Tumoren zumindest teilweise wiedergeben. Nachteilig für eine mikroskopische Arbeit ist die fehlende Kontrolle über die Tumorentstehung in einer zweiphotonenmikroskopisch erreichbaren Lage im Gehirn und die lange Generationszeit der meisten Modelle.

3. Eine chemische Tumorgenerierung durch Mutagene wie etwa Nitrosoharnstoff ist möglich, wird aber heute kaum noch verwendet.

Tierexperimentelle Modelle von Gehirnmetastasen verwenden üblicherweise Tumorzellinjektion in den linken Herzventrikel (Madden et al., 2013) (führt aber zu Multiorganmetastasen) oder in die Karotisarterie (Kienast et al., 2010). Verwendet werden hauptsächlich Brustkrebs-, Melanom- und Lungenkarzinomzellen. Diese Modelle simulieren die Schritte von der Wanderung einzelnen Tumorzellen in den Blutgefäßen, bis zum Anwachsen einzelner Zellen und der Entstehung von Makrometastasen. Sie reflektieren allerdings weder die Schritte der Intravasation vom Primärtumor noch einen möglichen Einfluss des Primärtumors auf den Ort der Metastasierung. Die Lage der Metastasen im Gehirn kann allerdings nicht beeinflusst werden. Dies führt zu einer hohen Varianz im Verlauf der Metastasenentstehung und erschwert therapeutische Studien.

Orthotope Injektionen von Metastasenzelllinien lassen die frühen Schritte der Extravasation aus, führen jedoch reproduzierbarer zu beobachtbaren Tumoren im Gehirn, insbesondere zur Beobachtung mit kraniellen Fenstern. Genetische Modelle von Gehirnmetastasen sind bisher nicht eingesetzt worden.

### **1.8 Zweiphotonenmikroskopie in Mausmodellen mit kraniellen Fenstern.**

Der wichtigste technische Aspekt dieser Arbeit liegt in der zweiphotonenmikroskopischen Untersuchung von Tumoren in Mausmodellen mit kraniellen Fenstern. Die Verwendung kraniieller Fenster (in der Literatur auch als chronische kraniale Fenster bezeichnet) zur wiederholten Untersuchung von Neuronen und Gliazellen in den Neurowissenschaften oder Blutgefäßen in der Schlaganfallforschung hat sich in den letzten Jahren als chirurgisch anspruchsvolle, aber auch anerkannte Methode etabliert (Helmchen & Denk, 2005). Auch in der Krebsforschung werden kraniale Fenster zur Untersuchung von Tumoren des Gehirns verwendet, allerdings ist die Anwendung weitaus weniger verbreitet. Ein wesentlicher Grund, diese im Vergleich zu Untersuchungen in histologischen Schnitten ungleich aufwändigeren und kostspieligeren Experimente mit kraniellen Fenster durchzuführen, liegt in der Möglichkeit dynamische Veränderungen und Parameter zu untersuchen. Aus diesem Grund finden sich Publikation zu intravitalmikroskopischen Untersuchungen in Tumormodellen oft im Rahmen der Angiogenese- oder Metastasenforschung.

Ein bedeutender Schritt auf dem Feld der Intravitalmikroskopie war die Entwicklung der Zweiphotonen Laser Scanning Mikroskopie (2P-LSM) (Denk et al., 1990). 2P-LSM basiert auf

Fluoreszenzanregung durch Zweiphotonenabsorption. Treffen zwei Photonen innerhalb sehr kurzer Zeit ( $\sim 0,5$  Femtosekunden) auf ein Fluorophor, addieren sie ihre Energien um das Fluorophor in einen angeregten Zustand zu versetzen. Technisch konnte die Zweiphotonenabsorption erst durch die Entwicklung von Lasern mit extrem kurzen Pulsen mit hohen Intensitäten realisiert werden. Ein typischer Zweiphotonenlaser emittiert Laserpulse zwischen 70 und 100 Femtosekunden ( $10^{-15}$  Sekunden) mit einer Frequenz unter 100 Megahertz und benötigt ein Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur. Verglichen mit der konventionellen Laser Scanning Mikroskopie eignet sich die Zweiphotonenanregung aus folgenden Gründen besonders für die Intravitalmikroskopie (Helmchen & Denk, 2005):

Konventionell verwendete fluoreszierende Proteine, die Licht im sichtbaren Bereich emittieren (z.B. GFP, YFP oder RFP), können über Zweiphotonenanregung im nah-infraroten Bereich angeregt werden. In diesem Wellenlängenbereich (700-1000 nm) ist die gewebeeigene Absorption und Streuung geringer als bei der gewöhnlichen Einphotonenanregung. Dies hat zur Folge, dass das Anregungslicht tiefer eindringen kann (bis zu 600-800  $\mu\text{m}$  im Gehirn) und weniger Phototoxizität auftritt.

Zweiphotonenanregung ist ein nichtlinearer Effekt und die Photonendichte außerhalb des Fokus nimmt quadratisch mit dem Abstand zur Fokusebene ab. Dies führt zu einer starken Beschränkung der Anregung auf den Fokus. Eine Lochblende, wie sie bei der konventionellen konfokalen Mikroskopie verwendet wird, ist deshalb nicht nötig. Der Vorteil ist, dass Regionen außerhalb des Fokus erst gar nicht bestrahlt werden. Weiterhin kann sämtliches Licht, das im Fokus emittiert wird, zum Signal beitragen. Dadurch kann die benötigte Energie, die auf das Gewebe trifft, reduziert werden.

Während häufig vereinfachend angeführt wird, dass zur Zweiphotonenanregung die doppelte Wellenlänge der Einphotonenanregung verwendet wird, haben Zweiphotonenspektren meist einen komplexeren Verlauf als lediglich eine Verdopplung des Einphotonenanregungsspektrums. Insbesondere fluoreszierende Proteine zeigen in der Regel zwei Maxima auf (Drobizhev et al. 2011). Das langwelligere Maximum entspricht in der Regel dem Doppelten des Einphotonen-Maximums, allerdings in der Regel mit einer mehr oder weniger starken Verschiebung hin zu kürzeren Wellenlängen. Das zweite, kurzwelligere Maximum entsteht durch Elektronenanhebung auf den nächsthöheren Zustand und tritt nur bei Zweiphotonenanregung deutlich auf. Fluoreszenz findet jedoch auch bei der Zweiphotonenanregung stets nur vom niedrigsten angeregten Zustand statt. Deshalb unterscheiden sich die Emissionspektren der Fluorophore nicht von der Emission bei Einphotonenanregung. Organische Farbstoffe wie Fluorescein oder Acridinorange haben dagegen oft ein breites Zweiphotonenanregungsspektrum mit mehreren lokalen Maxima (Bestvater et al., 2002), so dass sie über einen breiten Bereich eines kommerziell erhältlichen Titan-Saphir-Lasers (ca. 690-1020 nm) angeregt werden können. Durch geschickte Ausnutzung dieser spektralen Charakteristiken lassen sich verschiedenfarbige Fluorophore gleichzeitig mit einer Wellenlänge anregen.

Zusammenfassend bietet 2P-LSM eine tiefere Gewebepenetration bei geringerer Phototoxizität und einer erhöhten Sensitivität im Fokus.

Die ersten Arbeiten mit kraniellen Fenster in Tumormodellen wurden bereits vor der Verbreitung

kommerziell erhältlicher Zweiphotonenmikroskope mittels Hellfeldmikroskopie durchgeführt (Yuan et al. 1994) (Yuan et al., 1996). Diese frühen Arbeiten verfügten jedoch weder über die Penetrationstiefe noch über die Tiefenschärfe, die heute mit der 2P-LSM möglich ist.

Bisher existiert kein genetisches Mausmodell eines Gehirntumors, der bei adulten Tieren ausschließlich im für kraniale Fenster zugänglichen Bereich des Kortex entsteht. Aus diesem Grund werden in der Regel Tumore geschaffen, indem das kraniale Fenster geöffnet und eine Tumorzellsuspension flach ins Gehirn injiziert wird (Winkler et al., 2004, 2009). Erstmals konnte 2010 auch die Entstehung von Hirnmetastasen nach Injektion von Tumorzellen in die Halsschlagader in Echtzeit durch ein kraniales Fenster beobachtet werden (Kienast et al., 2010). Ein wesentlicher Vorteil der zweiphotonenmikroskopischen Studien gegenüber nicht invasiven Verfahren wie der Computertomographie oder Magnetresonanztomographie ist die unerreichte Auflösung, mit der selbst subzelluläre Details dargestellt werden können.



## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit teilt sich in zwei Vorhaben auf. Deren Gemeinsamkeit ist die in vivo Fluoreszenzmikroskopie von Blutgefäßen und Tumoren im Gehirn der Maus.

Eine stereotaktische Biopsie ist ein komplizierter Eingriff und kann nur von einem erfahrenen Neurochirurgen durchgeführt werden. Das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Projekt „Neurotax“ wurde ins Leben gerufen um folgende Problematiken bei der Durchführung stereotaktischer Biopsien anzugehen:

1. Die Unsicherheit bei der richtigen Positionierung erfordert die Anwesenheit eines erfahrenen Neuropathologen während des Eingriffs. Dies beschränkt diese Art von Eingriff auf große neurochirurgische Zentren mit einer Neuropathologie.
2. Glioblastome haben nur einen dünnen vitalen Tumorrand um einen großen nekrotischen Kern. Durch die fehlende visuelle Information während der Biopsie steigt das Risiko die Gewebeprobe nicht vom vitalen Tumorrand zu erhalten. Dies kann zu falschen Diagnosen führen oder eine Wiederholung des Eingriffs erfordern.
3. Durch die fehlende visuelle Information können auch größere Blutgefäße durch den Vorschub der Hohlneedle zerstört werden. Dadurch entstehende Blutungen können zu schweren Komplikationen führen.

Im ersten Teil der Arbeit, „Projekt Neurotax“, sollte deshalb eine neu entwickelte optische Fasersonde auf ihre grundlegende Anwendbarkeit am Patienten überprüft werden. Die wichtigsten Ziele der Validierung im Mausmodell waren:

- Die Darstellung von Gliomen im Mäusehirn mit einer Fasersonde unter Verwendung von 5-ALA
- Die Darstellung von Blutgefäßen im Mausmodell mit einer Fasersonde
- Die Detektion tief liegender Tumore und Gefäße beim Vorschub einer Fasersonde ins Mäusehirn
- Eine Einschätzung der Eignung des Systems zur Anwendung am Menschen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten zwei antiangiogene Antikörper gegen VEGF und Angiopoietin-2 auf ihre Wirkung auf Gehirnmastasen zweiphotonenmikroskopisch im Mausmodell mit kranialen Fenstern untersucht werden.

Die wichtigsten Ziele waren:

- Darstellung von Gesamtüberlebenszeit, Blutgefäßveränderungen und Tumorwachstum im Therapieverlauf
- Etablierung der Messung der Gefäßpermeabilität in Echtzeit im Therapieverlauf
- Kombination und Vergleich der antiangiogener Antikörper mit einer chemotherapeutischen Behandlung
- Kreuzung einer doppelt transgenen Mauslinie zur Untersuchung der Rolle von Mikroglia/Makrophagen mit humanen Gehirntumoren im Therapieverlauf.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte, Werkzeuge und Utensilien

Material	Hersteller	Referenznummer oder Bezeichnung des Herstellers
20x Wasser-Immersionsobjektiv	Zeiss, Jena	W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC $\infty/0,17$
Dichroitischer Teiler BS-MP 760++	Zeiss, Jena	000000 1989 686
Drillbohrer	FST, Heidelberg	18000-17
Drillbohrer: Bohrköpfe 0,5 mm	FST, Heidelberg	19007-05
Drillbohrer: Bohrköpfe 0,9 mm	FST, Heidelberg	19007-09
Heizkissen	FST, Heidelberg	21061-10: nur noch Größe 22,5 x 50 cm lieferbar
Heizkissen	Stoelting Europe, Dublin, Irland	50300V, 50304, 50305
Isofluranverdampfer	Abbott	Trajan808, Dräger
Kaltlichtquelle	Olympus, Planegg	KL15000LED
Kurzpass IR Blockfilter 760++	Zeiss, Jena	000000 1989 670
Mikromanipulator	Luigs und Neumann	SM-5
Pinzette #5	FST, Heidelberg	91150-20
Pinzette #3	FST, Heidelberg	11231-30
Pinzette #9 (Durapinzette)	FST, Heidelberg	SuperGrip S&T 0,3 mm x 0,25 mm Forceps, 00632-11
Schere	FST, Heidelberg	91460-11
Stereomikroskop	Olympus, Planegg	SZ51
Stereomikroskop	Zeiss, Jena	Stemi 2000-C
Stereomikroskop: Kamera	Zeiss, Jena	AxioCam ERc 5s
Stereomikroskop: Kaltlichtquelle	Zeiss, Jena	CL 1500 ECO
Stereotaktischer Operationstisch	David Kopf Instruments, USA; Vertrieb über Bilaney, Düsseldorf	DKI 900%920 Small Animal Stereotaxic without 920
Stereotakt: Kopfhalter für Mäuse	David Kopf Instruments, USA; Vertrieb über Bilaney, Düsseldorf	DKI 926 Mouse Adaptor
Stereotakt: Halterung für Hamiltonspritzen mit Mikrometerschraube	David Kopf Instruments, USA; Vertrieb über Bilaney, Düsseldorf	DKI 5000 Microinjection Unit
Sterilisator	FST, Heidelberg	Bead Sterilizer 18000-45
Thermoblock	Eppendorf	Mastercycler Pro
Titan:Saphir-Laser	Spectra Physics	MaiTai HP DeepSee
Wärmeplatte	FST, Heidelberg	21061-90
Zählkammer (Neubauer)	Brandt, Wertheim	5161078
Zentrifuge	Eppendorf	5804R
Zweiphotonenmikroskope	Zeiss, Jena	LSM7MP und LSM5MP

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Referenznummer oder Bezeichnung des Herstellers
1 kb-DNA-Marker	Peqlab, Darmstadt	25-2030
Agarose	Serva, Heidelberg	11404
Antiseptische Iodlösung	Braun, Melsungen	Braunol, 0839346
Auftragspuffer	Sigma, Taufkirchen	Gel Loading Buffer G2526-5ML
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen	423303
Carprophen	Pfizer, USA	Rimadyl WDT/07202
Cefotaxim	Pharmore, Australien	6460286
Chirurgische Schwämme aus Gelatine	Pfizer, USA, über Paesel + Lorei, Freiburg	Gelfoam 12-7 mm, 09-0315-08
Dentalkleber	Henry Schein Dental Depot, München	Cyano Veneer Fast 152261
Dentalzement	Henry Schein Dental Depot, München	Cyano Veneer Pulver A2 152254
Deckgläser, rund, 6 mm	Menzel Gläser, Möglingen	MEZ02130006
DMEM	Pan Biotech	P04-01549
DMSO	Sigma, Taufkirchen	D4540
DNA Farbstoff	Life Technologies, Darmstadt	Sybr-Gold S114940
DNA Isolationskit	Peqlab, Darmstadt	E.Z.N.A Tissue Kit
dPBS	PAN Biotech, Aidenbach	P04-36500
FBS	PAN Biotech, Aidenbach	3702-P111606
Geneticin	Gibco/Invitrogen, Darmstadt	G-418 Sulphate 11811-031
L-Glutamax	Life Technologies, Darmstadt	35050-061
Hamilton-Spritze 701RN (10 µl)	Sigma, Taufkirchen	20697
Isofluran	Abbot, Ludwigshafen	Forene 100% 4831850
Kanüle 0,3x12 mm	Braun, Melsungen	Sterican 4656300
Kanüle 0,4x20 mm	Terumo, Japan	Neolus 27G x 3/4 Nr. 20
Kontrollantikörper IgG	Novartis	Xolair 242138-07-4
Ketamin 50 mg/ml	Inresa, Freiburg	7714116
Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Melsungen	5/12612439/0112
Mundschutz	AMPri, Stelle	Med-Comfort 02101-W
PCR Kit	Qiagen, Hilden	HotStarTag Master Mix Kit 203445
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Darmstadt	15140-122
Pinseköpfe	Henry Schein Dental Depot, München	900-1382
Polyetheneschlauch 0,28/0,61 mm	Smith Medical	Portex 800/110/100
Saugtupfer	Kettenbach, Eschenburg	Sugi 30601
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen, Darmstadt	R-001-100
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel, Wetter	974116
Wattetupfer steril	Böttger	09.113.9105
Xylazin Hydrochlorid	Bayer AG, Leverkusen	Rompun 2%, 6293841.00.00
Zellkulturflaschen	Nuncbrand, Copenhagen	156499
Zentrifugenröhrchen	BD Biosciences	Falcon 15 ml 14-959-49D



### 3.3 Zellbiologische Methoden

#### 3.3.1 Wachstumsbedingungen von Zelllinien

Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator bei 37°, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigtem Wasserdampf in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Nuncbrand, Thermo Scientific) kultiviert. Vor dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde der Überstand abgenommen, einmal mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen und mit 2 ml Trypsin (0,025%) und EDTA (0,01%) drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Trypsinproteasen spalten extrazelluläre Membranproteine, dadurch lösen sich die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Der Vorgang wurde mit 5 ml DMEM Medium gestoppt und der Inhalt der Zellkulturflasche in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, BD Biosciences) überführt. Nach 3 Minuten Zentrifugation (Centrifuge 5804R, Eppendorf) bei 3000 g wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen und im Verhältnis 1:10 erneut in Kultur genommen.

#### 3.3.2 Verwendete humane Tumorzelllinien

Die verwendeten Tumorzelllinien exprimierten Fluorophore unter dem starken CMV- (Cytomegalo-Virus) Promotor. Als Fluorophor für U87-Glioblastomzellen wurde das grün fluoreszierende eGFP (enhanced green fluorescent protein, ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*) verwendet. Als Fluorophor für PC14-PE6 Lungenmetastasen wurde das rot fluoreszierende dsRed2 verwendet. DsRed2 ist eine verbesserte Variante von dsRed (ursprünglich aus der Koralle *Discosoma spec.*) und neigt weniger stark zu unspezifischen Aggregationen.

Zelllinie	Gewebeursprung	Hersteller
U87-GFP	Humanes Glioblastom	ATCC
PC14-PE6-dsRed2	Humanes Bronchialkarzinom, metastasierend	Fidler Labor, Kienast et. al, 2010

#### 3.3.3 Zellkulturmedien

Zelllinie	Komponenten
U87-GFP	500 ml DMEM 50 ml FBS (hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Glutamax (L-Alalin, L-Glutamin Quelle) 1 ml Geneticin (50 mg/ml)
PC14-PE6-dsRed2	500 ml DMEM 50 ml FBS (hitzeinaktiviert) 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Glutamax (L-Alalin, L-Glutamin Quelle)

#### 3.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Anzahl der Zellen wurde für Injektionen oder Einfrieren der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer (Brandt, Wertheim) bestimmt.

### 3.3.5 Präparation der Zellen für intrakranielle Injektionen

Analog zur Passagierung wurden Zellen für Injektionen ins Mäusegehirn vorbereitet. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und das Zellsediment mit einer 10 µl Hamilton-Spritze aufgenommen.

### 3.3.6 Einfrieren und Auftauen

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen mit oben mit Trypsin behandelt und in DMEM-Medium mit 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kryoprotektion resuspendiert. Jeweils 10<sup>5</sup> resuspendierte Zellen pro ml wurden in Kryoröhrchen mit einer Einfrierbox bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37° aufgetaut, die Zellen abzentrifugiert und in frischem DMEM-Medium aufgenommen. Für die ersten 24 h wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> (Nuncbrand, Thermo Scientific) überführt, danach in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup>.

## 3.4 Tierversuche

### 3.4.1 Mauslinien

#### 3.4.1.1 NMRI: *Foxn1*<sup>nu</sup>

Diese Linie wurde von Jackson Laboratory, USA bezogen und trägt den offiziellen Namen Crl:NU-*Foxn1*<sup>nu</sup>. Sie ist auf dem Albino-Hintergrund NMRI (Naval Medical Research Institute) gezüchtet, die Bezeichnung Nacktmaus oder J:Nu (nude; englisch: nackt) ist ebenfalls geläufig. Das Allel „nu“ trägt eine Basendeletion im dritten Exon des Transkriptionsfaktor *Foxn1* (forkhead box N1) die zu einer Rasterschubmutation und einem vorzeitigen Stoppkodon führt. Nur homozygote Tiere sind haarlos und athymisch. Das Fehlen des Thymus führt zu einer Vielzahl von Defekten des Immunsystems, insbesondere dem Fehlen von T-Lymphozyten. Dadurch eignen sich diese Tiere als Wirt für Tumorzelltransplantationen humanen Ursprungs. Weibchen sind zwar fruchtbar, können jedoch aufgrund unterentwickelter Brustdrüsen ihre Jungen nicht stillen. Zur Generation homozygoter Nachkommen wird ein heterozygoten Weibchen (Genotyp: *Foxn1*<sup>nu/nu</sup>) mit einem homozygoten, (nacktem) Männchen (Genotyp: *Foxn1*<sup>nu/+</sup>) verpaart. In der Regel erhält man weniger als die theoretisch zu erwartenden 50 Prozent an homozygoten Nachkommen, da die nackten Tiere etwas schwächer sind als ihre heterozygoten Wurfgeschwister und häufiger von der Mutter getötet werden.

#### 3.4.1.2 C57BL/6J:Cx<sub>3</sub>cr1<sup>GFP</sup>

Diese Linie wurde von S. Jung (Jung et al., 2000) erzeugt und über Jackson Laboratory, USA bezogen. Sie ist auf dem Hintergrund C57BL/6J gezüchtet. In der Linie ist der Sieben-Transmembranrezeptor CX<sub>3</sub>CR1, auch als Fraktalkin Rezeptor bekannt durch eGFP ersetzt. Bereits heterozygote Tiere (Genotyp: *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/+</sup>) zeigen eine starke eGFP-Expression in

Monozyten, einem Teil der NK- und dendritischen Zellen, sowie den Makrophagen des Gehirns, der Mikroglia. Während die homozygote Deletion des *Cx<sub>3</sub>cr1*-Gens diverse Auswirkungen auf die Rolle der Mikroglia in Entwicklung und Pathologie des Gehirns hat, konnten für heterozygote Tiere keine Veränderungen im Phänotyp der Mikroglia gefunden werden (Wolf et al., 2013).

#### 3.4.1.3 Verkreuzung einer doppelt transgenen Linie: *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP</sup> x *Foxn1*<sup>nu</sup>

Diese Linie wurde im Tierstall des Zentrums für Neuropathologie gekreuzt. Analog zur Zucht der NMRI: *Foxn1*<sup>nu</sup> Tiere können nur *Foxn1*<sup>nu</sup>-heterozygote Weibchen verwendet werden. Zunächst wurden homozygote C57BL/6J *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/GFP</sup> Weibchen mit homozygoten NMRI *Foxn1*<sup>nu/nu</sup> Männchen gekreuzt. Alle Nachkommen dieser F<sub>1</sub>-Generation sind heterozygot für beide Merkmale und werden untereinander verkreuzt. Aus den F<sub>2</sub>-Nachkommen dieser Verpaarung wurden nackte Männchen ausgewählt und der *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP</sup> Genotyp mittels PCR bestimmt.

*Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/GFP</sup> x *Foxn1*<sup>nu/nu</sup> Männchen können nun mit *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/GFP</sup> x *Foxn1*<sup>nu/+</sup> Weibchen zur Zucht einer *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/GFP</sup> homozygoten Linie verwendet werden. Auf diese Weise sind für die weitere Zucht keine Genotypisierungen notwendig, da alle Verpaarungen nur *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/GFP</sup> homozygote oder nur *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/+</sup> heterozygote Nachkommen haben, aus denen die immundefizienten Tiere am fehlenden Fell erkennbar sind.

#### 3.4.2 Maushaltung

Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte in der zentralen Tierhaltung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung. Die Tiere wurden in Gruppen von bis zu 6 Tieren nach Geschlecht getrennt gehalten. Die Mäuse befanden sich in einem PVC-Käfig und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von 8 bis 12 Wochen (bei Versuchsbeginn) verwendet. Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere in eine gesonderte Tierhaltung überführt. Ab der Operation des kraniellen Fensters wurden die Tiere einzeln gehalten, um Beschädigungen des kraniellen Fensters durch andere Tiere zu vermeiden. Alle Tierversuche wurden bei der Regierung von Oberbayern beantragt und von dieser genehmigt.

#### 3.4.3 DNA-Präparation aus Schwanzspitzen

Zur Genotypisierung wurde den Tieren im Alter von 3-4 Wochen eine Schwanzbiopsie oder Ohrmarkierung entnommen. Die Isolation der genomischen DNA wurde mit dem E.Z.N.A Tissue Kit von Peqlab nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

#### 3.4.4 *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP/+</sup> Genotypisierung

Für die Zucht der Nacktmäuse war keine Genotypisierung notwendig, da alle homozygoten Tiere haarlos sind, alle heterozygoten Tiere Fell tragen und in einer Kreuzung von heterozygoten Weibchen mit homozygoten Männchen keine Wildtypen auftreten. Die Genotypisierung des *Cx<sub>3</sub>cr1*<sup>GFP</sup>-Lokus ist notwendig, da homozygote Tiere nicht zuverlässig aufgrund der GFP-Intensität von heterozygoten Tieren unterscheiden werden können und in der Generierung der Linie unterschiedliche Genotypen eines Wurfs auftreten.

Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und

Agarosegelelektrophorese. Zur PCR wurde das HotStarTag Master Mix Kit von Qiagen mit einem Thermoblock (Eppendorf) verwendet. Es werden drei Oligonukleotide verwendet, für das Wildtyp Allel (Forward Primer IMR3945), für das GFP Allel (Forward Primer IMR3946) und eines entgegengesetzt die Insertionsstelle flankierend (Reverse Primer IMR3947). Oligonukleotidsequenzen und PCR-Komponenten sind in den Tabellen beschrieben.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte mittels Gelelektrophorese. Ein einprozentiges Agarosegel mit 2% Farbstoffmischung Sybr-Gold (1 µg/ml, Life Technologies) wurde in eine Gelkammer mit Tris-Acetat-EDTA-Puffer gegeben. 2 µl der PCR-Proben wurde mit 8 µl Auftragspuffer (Gel Loading Buffer, Sigma) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 80 mV 20 Minuten lang aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte durch UV-Licht und mit einer Digitalkamera (PowerShot G1). Ein Größenvergleich wurde mit Hilfe einer 1 kb-DNA-Leiter (Peqlab) durchgeführt. Wildtyp Allele ergeben eine Bande von 970 Basenpaaren, GFP Insertionen eine Bande von 1100 Basenpaaren. Heterozygote Tiere zeigen beide Banden auf.

#### Oligonukleotide:

Name	Sequenz (5'-3')	Länge (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
IMR 3945	TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG	20	61,4
IMR 3946	GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG	20	61,4
IMR 3947	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG	20	61,4

#### 25 µl PCR Ansatz:

Volumen (µl)	Produkt	Konzentration
10	HotStarTag Hot MasterMix	-
1	Primer IMR 3945	10 µM
1	Primer IMR 3946	10 µM
1	Primer IMR 3947	10 µM
1	DNA	10 ng/µl
11	H <sub>2</sub> O	-

#### PCR Programm (Eppendorf Cycler):

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Wiederholungen
1	95	15 min	x 1
2	95	30 s	x 35
3	60	30 s	
4	68	2 min	
5	68	10 min	x 1
6	4	∞	

**Ergebnisse: 1% Agarosegel**

Genotyp	970 bp	1100 bp
<i>Cx<sub>3</sub>cr1</i> +/+	+	-
<i>Cx<sub>3</sub>cr1</i> GFP/+	+	+
<i>Cx<sub>3</sub>cr1</i> GFP/GFP	-	+

**3.4.5 Narkosen**

Bei operativen Eingriffen (kranielles Fenster und Tumorzellinjektionen) wurden die Tiere durch intramuskuläre Injektion einer Natriumchlorid-Lösung mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Tiere erwachen nach 60-75 Minuten aus der Narkose.

Mikroskopische Untersuchungen wurden unter Inhalationsnarkose mit einem Sauerstoff/Isofluran-Gemisch durchgeführt. Zur Einleitung wurden 5% Isofluran verwendet, die Tiere werden dabei in einer abgeschnittenen durchsichtigen Plastikflasche begast. Zur Erhaltung der Narkose wurde nach etwa 2 min. auf 1% Isofluran reduziert. Die Mäuse wurden während der Mikroskopie durch eine abgeschnittene 5-ml-Plastikspritze, die über die Schnauze gezogen wird, begast. Die Tiere erwachen wenige Sekunden bis Minuten nach dem Ende der Isofluranzufuhr. Während sämtlicher Narkosen müssen sich die Tiere auf einem 37° warmem Heizkissen befinden, um ein rasches Auskühlen der Tiere zu vermeiden.

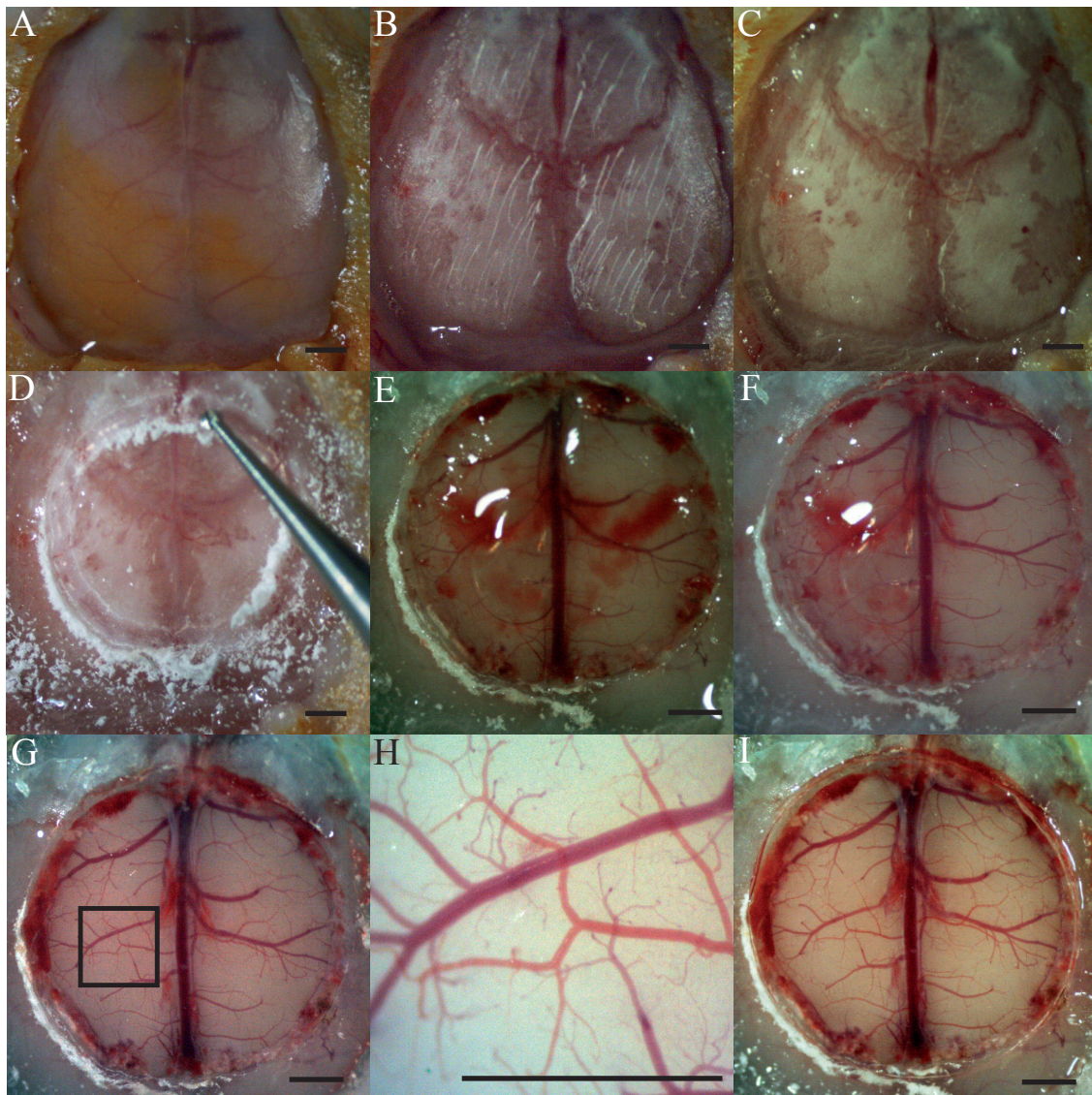
**3.4.6 Operation des kraniellen Fensters**

Die Operation des kraniellen Fenster (Abb. 4) wird im Wesentlichen wie beschrieben durchgeführt (Kienast et al., 2010; von Baumgarten et al., 2011). Wesentliche Unterschiede zu einem Standardoperationsprotokoll (Holtmaat et al., 2009) bestehen in einem etwas größerem Fensterdurchmesser (6 mm), einer Maushalterung mit einem Titanstift und dem Wiederöffnen des Fensters zur Tumorumplantation.

Vor dem Eingriff wurden Operationsbesteck und die Wattetupfer autoklaviert. Instrumente wurden nach jeder Verwendung mit Ethanol gereinigt und im Sterilisator sterilisiert. Die feinen Eingriffe erforderten die Verwendung eines Stereomikroskops und einer Kaltlichtquelle mit Schwanenhalsleuchten. Vor der Operation wurden die Mäuse gewogen. Die Anästhesie wurde mit Ketamin/Xylazin wie oben beschrieben durchgeführt. Um das Austrocknen der Augen zu vermeiden, wurden diese mit Salbe (Bepanthen) bedeckt. Die Mäuse wurden mit Hilfe der Schneidezahnhalterungen und einem Paar Ohrenstifte auf dem stereotaktischen Tisch (David Kopf Instruments) fixiert. Die Kopfhaut wurde mit Jodlösung (Braunol) desinfiziert. Die Tiere erhielten zu diesem Zeitpunkt zur ergänzenden postoperativen Analgesie Carprophen (7,5 mg/kg Körpergewicht) und als antibiotische Prophylaxe das Antibiotikum Cefotaxim (250 mg/kg Körpergewicht) subkutan in 100 µl Kochsalzlösung verabreicht. Mit einer Pinzette und einer Schere wurde die Kopfhaut von der Mitte der Augen bis zur Mitte der Ohren entfernt. Mit einem Skalpell wurde die Knochenhaut sorgfältig abgeschabt und der Schädel freigelegt. Nach einer kurzen Wartezeit wurde der möglichst trockene Schädel mit der Spitze des Skalpells angeraut.



Während der folgenden Schritte wurden Knochenspäne mit einem kleinen Pipettierball durch eine 1000  $\mu$ l Pipettenspitze weggeblasen. Anschließend wurde mit einem Pinselkopf eine feine Schicht Dentalkleber aufgetragen. Hierbei muss besonders sorgfältig gearbeitet werden, da diese Schicht das Fundament für die gesamte Konstruktion bildet und damit wesentlich für die Stabilität und den Erfolg der Operation verantwortlich ist. Nach etwa 3-4 Minuten ist die Schicht ausreichend erhärtet. Nun wird mit einem Feinbohrer (0,9 mm Bohrkopf) eine flache kreisrunde Vertiefung mit einem Durchmesser von 6 mm gebohrt. Es wurde darauf geachtet unterhalb der lateralen Blutgefäße zwischen den Augen zu arbeiten, sowie oberhalb von Lambda. Mit einem feineren Bohrkopf (0,5 mm) wurde nun die Schädeldecke vorsichtig kreisförmig durchbohrt.



**Abbildung 4: Operation des kraniellen Fensters**

A: Kopfhaut entfernt, Schädel freigelegt, Gelbfärbung durch Desinfektionslösung. B: Knochenhaut entfernt, Schädel wurde mit einem Skalpell angeraut. C: Schädel wurde mit einer feinen Schicht Acrylkleber bedeckt. D: Bohrung einer kreisförmigen Öffnung von etwa 6 mm. E: Schädeldecke wurde abgehoben, Dura mater noch intakt. F: Dura mater wurde über der rechten Hemisphäre entfernt. G: Dura mater wurde über beiden Hemisphären entfernt. Über dem Sinus sagitalis in der Mitte und an einigen lateralen Gefäßen wurde die Dura nicht entfernt, da sie mit den Gefäßen verwachsen war. H: Ausschnitt aus G, auch kleine Gefäße sind unbeschädigt. I: Nach Anbringen des 6 mm Deckglases. Maßstabsbalken 1 mm.

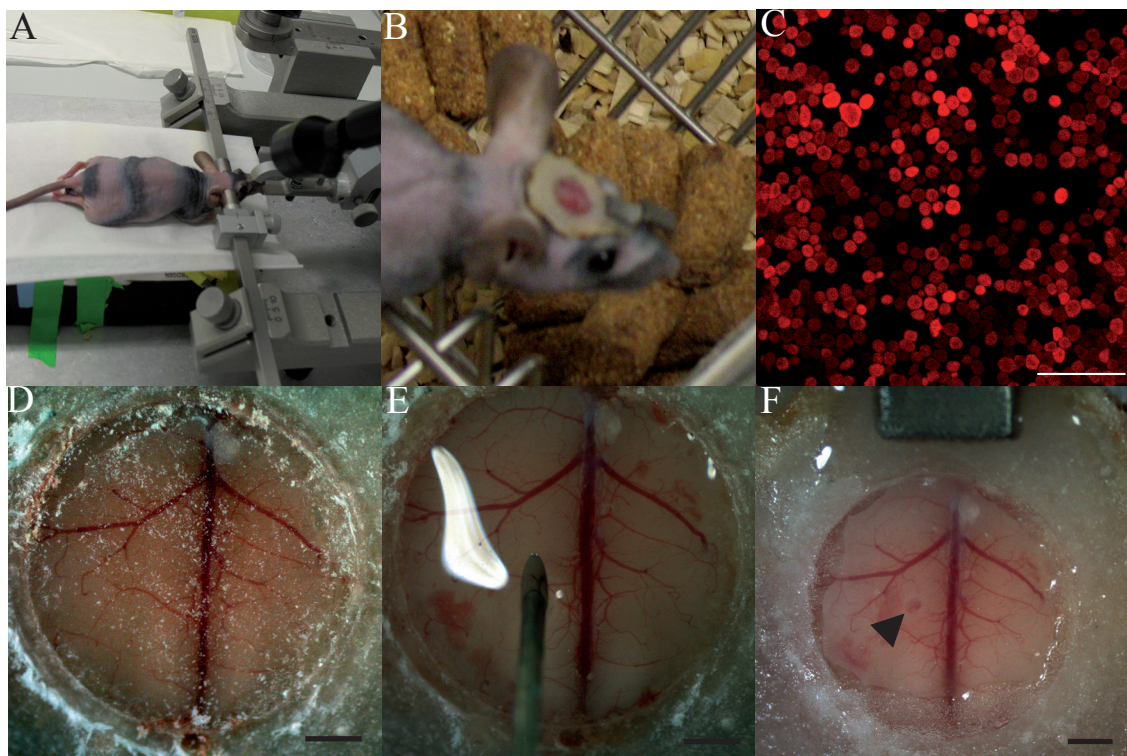
Bohrspäne wurden weggeblasen oder mit Natriumchloridlösung weggespült. Die beiden Stellen mittig über dem Sinus sagittalis superior wurden als letztes durchbohrt. Es konnten kleine Blutungen der Gefäße in der Schädeldecke auftreten, diese schlossen sich meist jedoch schnell ohne weitere Maßnahmen. Nun wurde das Bohrloch mit Kochsalzlösung bedeckt und die Schädeldecke seitlich mit zwei Pinzetten gefasst. Über einen Zeitraum von 1-2 Minuten wurde nun durch sanften Zug die Schädeldecke abgehoben. Hierbei ist besondere Sorgfalt nötig, da es sich um den kritischen Schritt der Operation handelt. Bei etwa 10-20 % der Tiere ist die Dura mater sowohl mit der Schädeldecke als auch mit dem großen mittleren Blutgefäß, dem Sinus sagittalis superior verwachsen. Dadurch besteht die Gefahr das große Gefäß beim Abheben der Schädeldecke zu verletzen. Kleinere Blutungen konnten durch nasse chirurgische Schwämme gestoppt werden. Traten stärkere Blutungen auf die nicht mehr gestoppt werden konnten, wurde das Tier durch zervikale Dislokation euthanasiert. Das freiliegende Gehirn wurde zu jeder Zeit mit Kochsalzlösung bedeckt gehalten, um eine Austrocknung zu vermeiden. Nun wurde mit der Durapinzette vorsichtig die Dura mater abgezogen. Da die Dura meist mit dem Sinus sagittalis superior verwachsen ist, wurde sie an dieser Stelle nur vorsichtig über das Gefäß gefaltet. Vorsicht war ebenfalls bei den fast immer vorhandenen 2-4 großen lateralen Gefäßen geboten. War erkennbar, dass diese sich mit der Dura bewegen lassen, wurde die Dura an dieser Stelle nicht entfernt. Abschließend wurde das Gehirn mit einem runden Deckglas von 6 mm Durchmesser geschlossen und die Ränder mit einem Gemisch aus Dentalkleber und Dentalzement unter Verwendung einer Kanülennadel verschlossen. Es wurde darauf geachtet nicht zu dicke Schichten Kleber über den Rand des Deckglases aufzutragen, da dieses bei der Tumorzellinjektion wieder entfernt werden muss. Treten keine Komplikationen auf, war die Operation bei einem erfahrenen Operateur in 40-45 Minuten abgeschlossen. Bis zum Aufwachen der Tiere wurden diese auf einer 37 °C Heizplatte warm gehalten.

### **3.4.7 Tumorzellinjektionen ins Gehirn**

Drei bis vier Wochen nach der Implantation des kraniellen Fensters wurden Tumorzellinjektionen in den Kortex durchgeführt (Abb. 5). Zu Beginn wurde der stereotaktische Tisch vorbereitet. Der Aufbau des stereotaktischen Operationstisches war analog zur Operation des kraniellen Fensters. Tumorzellen wurden 2-3 Minuten mit Trypsin behandelt (2 ml) und mit DMEM-Medium (3 ml) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen 3 Minuten bei 1400 Umdrehungen/Minute abzentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellsediment durch Klopfen gelockert. Mit einer 10 µl Hamiltonspritze wurde unter der Vermeidung von Luftblasen langsam die Zellsuspension (etwa  $10^5$  Zellen/µl) aufgezogen und die Spritze in der Halterung des stereotaktischen Tisches angebracht. Die Tiere wurden erneut gewogen, mit Ketamin/Xylazin narkotisiert und wie oben fixiert. Das kraniale Fenster und der Schädel wurden zu Beginn sorgfältig mit Iodlösung (Braunol) desinfiziert. Dann wurde die Iodlösung mit 70-prozentigem Ethanol weggespült. Dabei wurden die Augen der Tiere mit einem Labortuch bedeckt. Mit einem groben Bohrkopf (0,9 mm) wurde die Zementfläche zwischen den Augen abgeschliffen, um Unebenheiten oder Bruchstellen zu entfernen. Mit einem feineren Bohrkopf (0,5 mm) wurde nun entlang der Oberkante des Deckglases der Kleber ringsum entfernt, bis das Deckglas völlig frei liegt. Das Glas ist ausreichend stabil um Berührungen mit dem Bohrer auszuhalten. Mit Kochsalzlösung



wurden Bohrspäne entfernt. Anschließend wurde vorsichtig der Kleber seitlich neben dem Deckglas entfernt. Oft löste sich dabei das Deckglas. Alternativ konnte es vorsichtig mit einer Pinzette abgehoben werden. Das freiliegende Gehirn wurde sofort mit etwas Kochsalzlösung bedeckt. Vor dem Einstich wurde die Nadelspitze unter dem Operationsmikroskop betrachtet und die Mikrometerschraube des Stempels langsam nach unten bewegt. Erst wenn die Zellsuspension aus der Nadel austritt, konnte eine korrekte Injektion durchgeführt werden. Die Nadelspitze wurde gereinigt und mittig 2 mm rechts des Sinus sagittalis bis in eine Tiefe von 1,5 mm eingestochen. Dann wurde die Nadel 0,5 mm zurückgezogen, um eine Kavität für die Tumorzellen zu schaffen. Beim Einstich wurde darauf geachtet, keine großen Gefäße zu verletzen. Über einen Zeitraum von etwa fünf Minuten wurde nun langsam 1  $\mu$ l Zellsuspension ( $10^5$  Zellen) injiziert. Nach drei Minuten Wartezeit wurde die Nadel langsam über einen Zeitraum von etwa zwei Minuten zurückgezogen. Die Gehirnoberfläche wurde einige Male mit Kochsalzlösung gespült und ein neues Deckglas aufgelegt. Meist war es möglich, das Deckglas in exakt der gleichen Position wie zuvor anzubringen. Mit einer Mischung aus Dentalkleber und Zement wurden die Ränder des Deckglases mit dem bestehenden Helm verklebt. Zwischen den Augen wurde eine Schicht Dentalkleber aufgetragen. Nach etwa zwei Minuten Wartezeit wurde auf diese Schicht ein Titanstift angebracht. Mit einer Pinzette wurde der Stift möglichst parallel zum Deckglas



**Abbildung 5: Öffnen des Fenster zur Tumorentplantation**

A: Stereotaktischer Tisch mit Ohrenhalterungen. B: Kranielles Fenster mit Titanstift 8 Wochen nach Operation. C: dsRed2-PC14-PE6 Lungenmetastasenzellen in vitro. Maßstabsbalken in C: 50  $\mu$ m. D: Kreisförmige Bohrung um das Deckglas. E: Freiliegendes Gehirn mit Injektionsnadel der Hamilton-Spritze. F: Nach dem Verschließen des Fensters mit einem neuen Deckglas. Die Pfeilspitze deutet auf die Injektionsstelle. Der Titanstift wurde nach dem Verschließen des Fensters angebracht. Maßstabsbalken D-F: 1 mm.



ausgerichtet und anschließend mit Dentalkleber bedeckt und fixiert. Der Eingriff war bei einem erfahrenen Operateur in 30 Minuten abgeschlossen, normalerweise traten keinerlei Verletzungen oder Komplikationen auf, da lediglich am Zementhelm manipuliert wurde. Das Gehirn wurde nur durch den Nadeleinstich beeinträchtigt. Die Tiere wurden bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer 37° Wärmeplatte gehalten. Es wurden aus jeder Zellpräparation nicht mehr als drei Tiere injiziert.

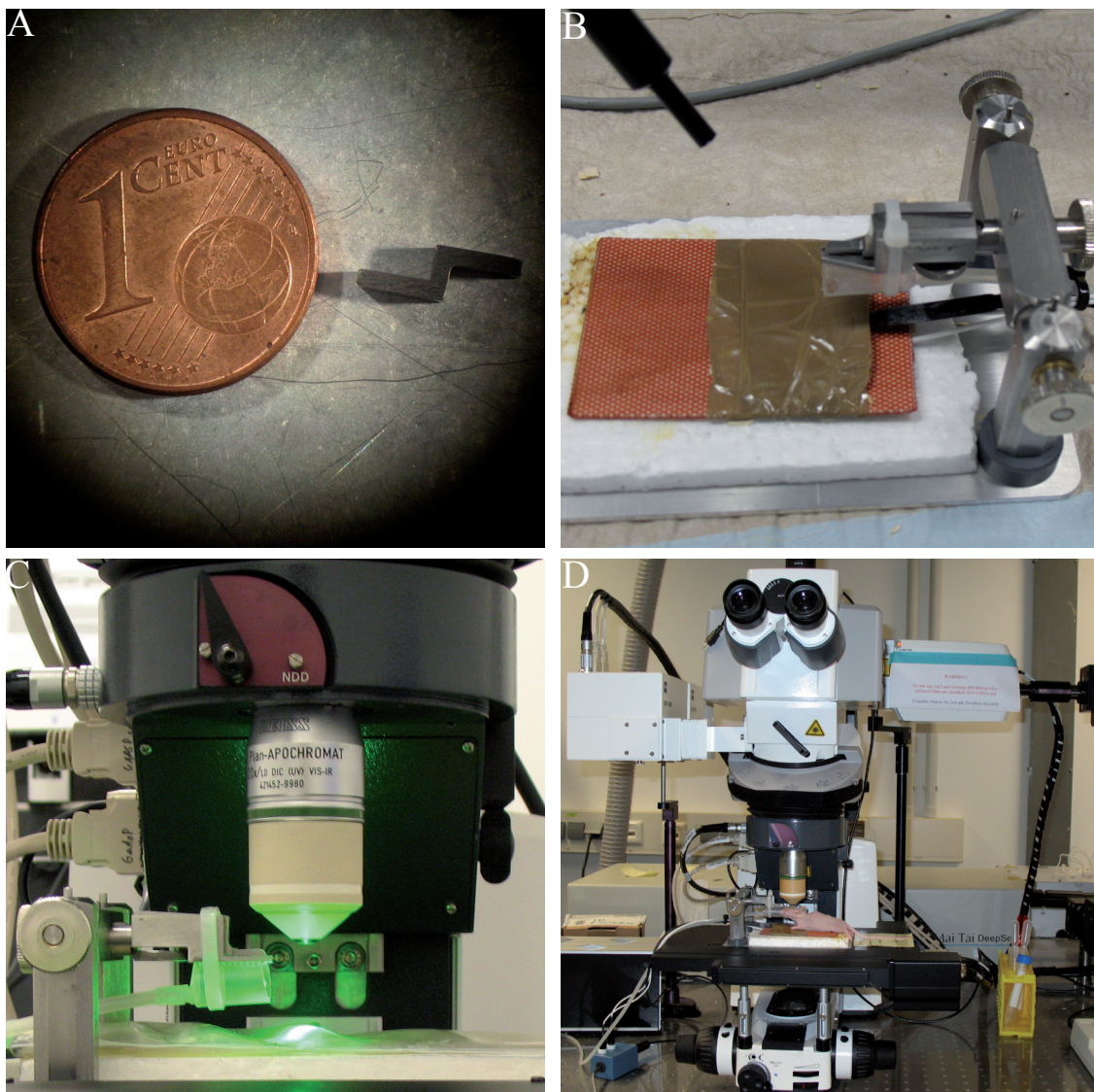
#### 3.4.8 Zweiphotonenmikroskopie

Zweiphotonenmikroskopische Intravitaluntersuchungen wurden an einem kommerziellen Carl Zeiss LSM7MP oder LSM5MP Mikroskop durchgeführt (Abb. 6). Eine wesentliche Modifikation am verwendeten LSM7MP ist der Einbau eines zusätzlichen Gallium Arsenid Phosphid Detektors direkt über dem Objektiv („Near-GaAsP“), der eine höhere Sensitivität erzielt und zur Detektion grüner Fluorophore verwendet wurde. Als Laserquelle wurde ein MaiTai Titan-Saphir Laser (Spectra Physics) verwendet. Die Fixierung der Tiere fand mittels einer Tischhalterung im Eigenbau statt. Grundsätzlich folgt der Aufbau der Halterung wie zuvor beschrieben (Belluscio, 2005). Die Z-Stifte aus Titan, die am Kopf der Maus befestigt sind, können mit einer schraubstockartigen Vorrichtung exakt fixiert werden. Der bogenförmige Aufbau der Halterung besitzt weiterhin zwei Freiheitsgrade der Rotation um Kippungen auszugleichen. Alternativ können diese Drehschrauben mit Metallstiften fixiert werden, um die wiederholte Positionierung mittels eines Koordinatensystems zu erleichtern. Die Halterung ist auf einer Metallplatte verschraubt. Zur Temperaturregulierung der Tiere ist eine Wärmematte angebracht. Zur Temperaturisolation der Metallplatte von der Wärmematte, trennt eine ca. 1 cm dicke Styroporplatte Metall und Wärmeplatte. Die Spitze einer abgeschnittenen 5 ml Spritze dient als Maske für Inhalationsnarkosen und wurde mit einem Kabelbinder an der Unterkante der Maushalterung fixiert. Experimente wurden mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, numerische Apertur 1,0) und einem Tropfen vollentsalztem Wasser über dem Deckglas des kraniellen Fensters durchgeführt. Die Detektion von grünen Fluorophoren wurde mit einem Bandpass-Filter BP500-550 vor einem GaAsP-Detektor durchgeführt. Detektion von roten Fluorophoren wurde mit einem Bandpass-Filter BP575-610 vor einem GaAsP-Detektor durchgeführt. Detektion von nah-infraroten Fluorophoren wurde mit einem Bandpass-Filter BP640-710 vor einem „non-descanned Detektor“ (NDD) Photomultiplier durchgeführt. Zur Detektion von nah-infraroten Fluorophoren (Evans Blue) wurde der dichroitische Hauptstrahlteiler BS-MP 690++ durch den Hauptstrahlteiler BS-MP 760++ ersetzt, sowie der Kurzpass Blockfilter LBF690++ im Strahlengang vor den Detektoren durch den Kurzpass Blockfilter LBF 760++ ersetzt. Zur simultanen Anregung von dsRed2 und Fluorescein wurde 750 nm als Wellenlänge verwendet. Zur simultanen Anregung von dsRed2 und eGFP wurde 920 nm als Wellenlänge verwendet. Zur simultanen Anregung von Acredinorange und dsRed2 wurde 980 nm verwendet. Zur Anregung von Evans Blue wurde 950 nm verwendet. Zur simultanen Anregung von dsRed2, eGFP und Evans Blue wurde 920 nm verwendet. Zur simultanen Anregung von Acredinorange, dsRed2 und Evans Blue wurde 980nm verwendet.

Die Dimensionen eines dreidimensionalen Bildstapels betrugen in der Regel 424x424x300 µm bei einem Z-Abstand von 3 µm, 1024x1024 Pixeln in der x-y Dimension und einer Pixelzeit von

1,6  $\mu$ s. Aufnahmen zur Permeabilität und zu Mikrogliabewegungen wurden über einen Zeitraum von 30 min. im Abstand von 4 bzw. 5 Minuten durchgeführt. Hier wurde ein Bildstapel von lediglich 100 oder 50  $\mu$ m Tiefe aufgenommen. Zur Erhöhung der aufgenommenen Fläche pro Tier wurde ein „3D-tile-scan“ über 4x4 aneinander angrenzende Regionen aufgenommen (Abb. 7). Diese Technik wurde für die Untersuchungsgruppen der Experimente von Chemotherapie und Mikroglia angewandt. Sie wurden durch einen motorisierten x-y-Tisch ermöglicht, dessen Steuerung in die Mikroskopsoftware (Zen2009, Zeiss) integriert ist. Die Aufnahme einer 1700x1700x330  $\mu$ m Region dauerte 32 Minuten. Zur wiederholten Darstellung identischer Regionen wurden die Koordinaten des Tisches und Blutgefäßmuster verwendet.

Tumorgößen wurden durch Messung der Seitenlängen in x- und y-Dimensionen mit Hilfe des Koordinatensystems des motorisierten Tisches durchgeführt. Bei der Bestimmung des

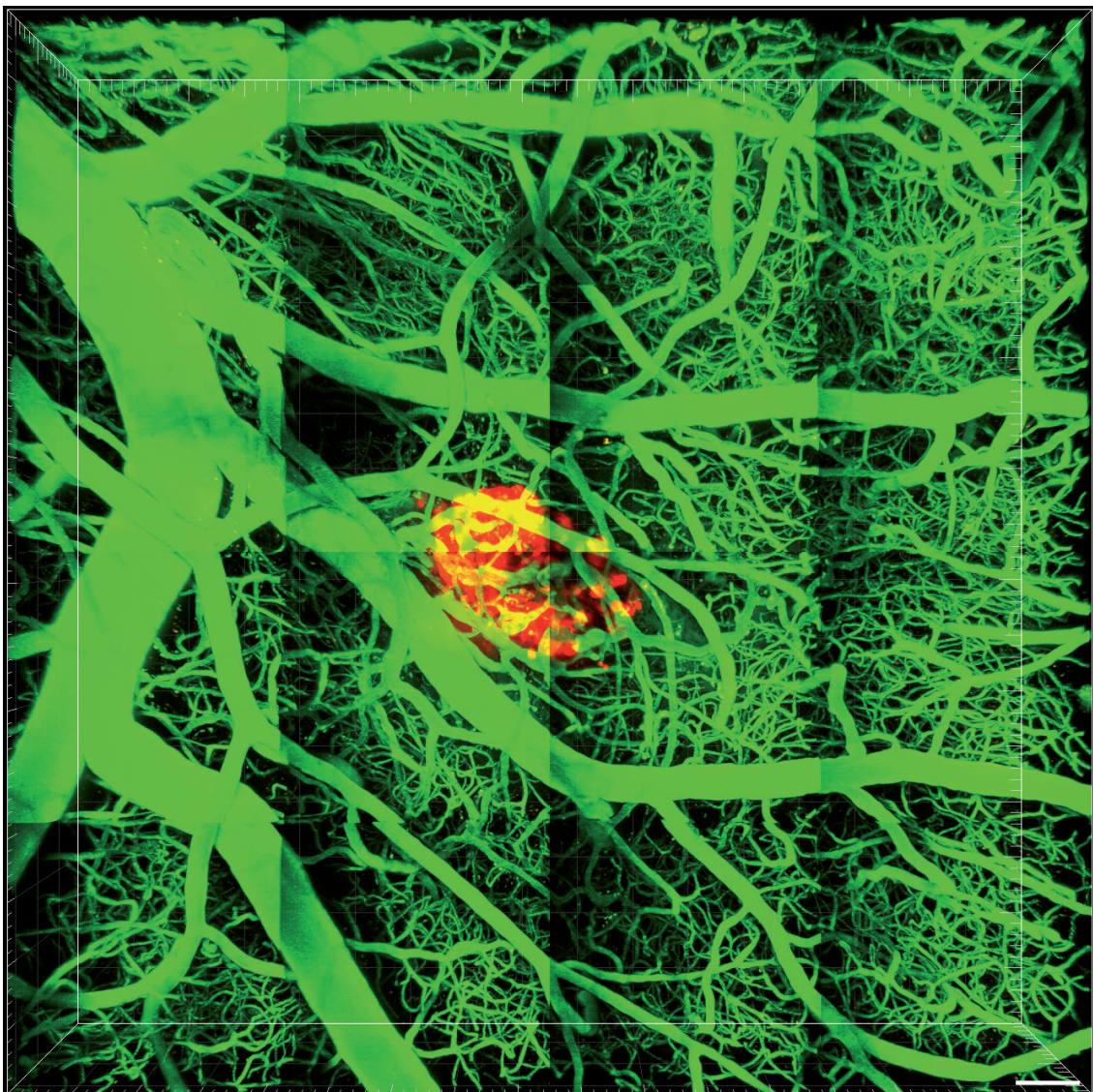


**Abbildung 6: Halterung und Mikroskoptisch für Intravitalmikroskopie**

A: Titanstift (rechts) in Z-Form zur Befestigung am Mäuseschädel. B: Mikroskoptisch aus Stahl, Isolation aus Styropor mit Heizkissen. An der drehbaren Halterung ist eine abgeschnittene Plastikspritze als Gasmaske für Inhalationsnarkosen angebracht. C: Mikroskoptisch in Position unter dem Objektiv. D: Zweiphotonenmikroskop LSM 7MP mit Versuchstier in Narkose



Überlebenszeit wurde der Endpunkt aufgrund eines klinischen Wertesystems festgelegt. Blutflussgeschwindigkeiten wurden an Mikroskopiezeitpunkt Tag 6 durchgeführt. Zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers wurde eine schnelle Übersichtsaufnahme der Gefäße durchgeführt. Dann wurden 3000 Wiederholungen eines Linien-Scans (line-scan Modus) entlang der zentralen Achse eines Blutgefäßes aufgenommen. Typische Linien hatten eine Länge von 10-20  $\mu\text{m}$ , eine Aufnahme dauerte etwa 5-10 Sekunden. Die erhaltenen Bilder wurden mit der LSM510 Software ausgewertet. Für jedes Gefäß wurde die Geschwindigkeit viermal bestimmt und gemittelt. Es wurde für jedes Tier 5-30 Gefäße gemessen, dabei wurden die kleinsten auffindbaren Kapillaren ausgewählt.



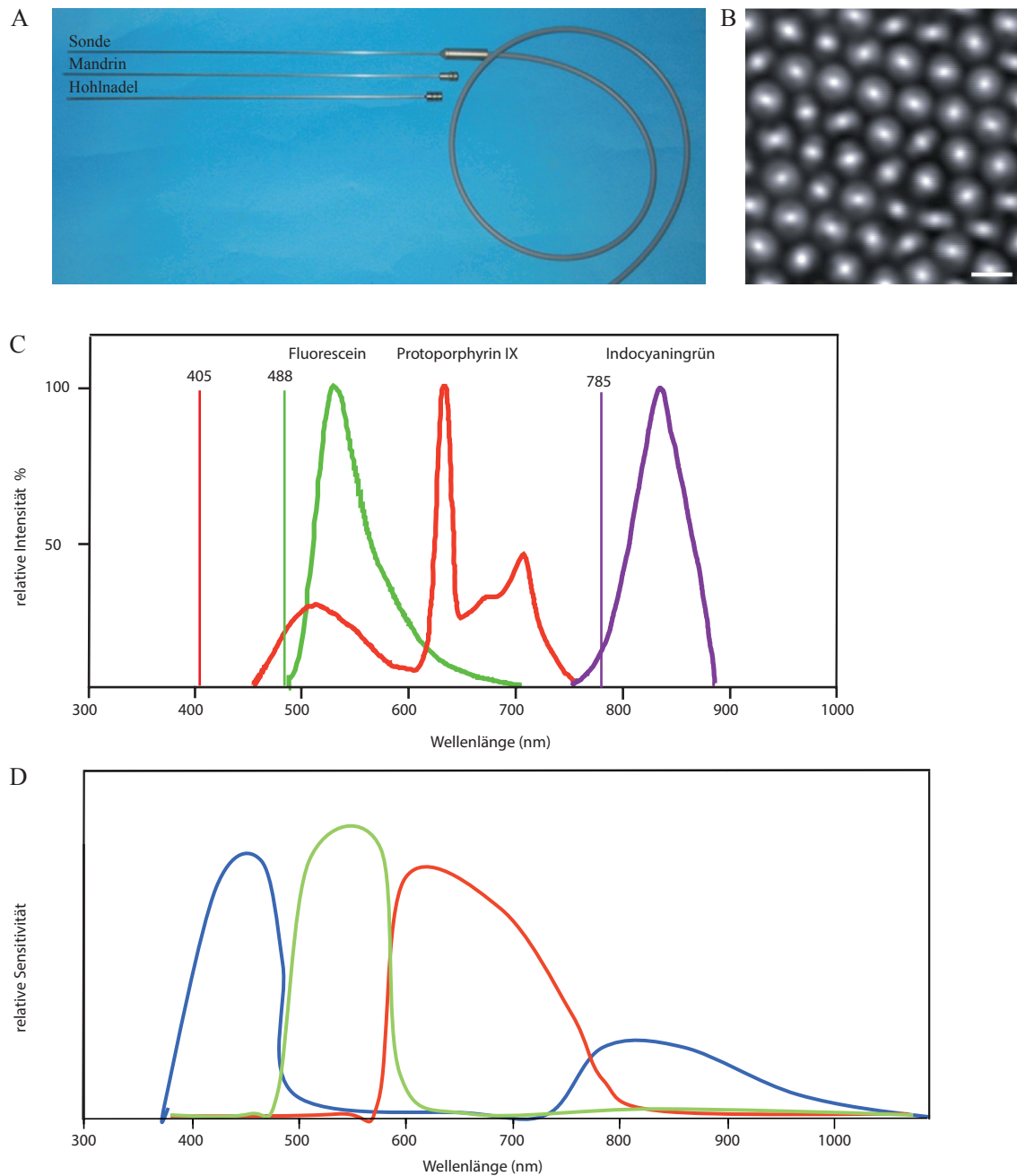
**Abbildung 7: In vivo 3D Tile-Scan**

Typische Aufnahme eines 4x4 Tile-scans mit dsRed2-PC14-E6 Tumorzellen (rot) und FITC-Dextran markierten Blutgefäßen (grün). Die Aufnahme wurde an Tag 4 nach der Tumorzellinjektion durchgeführt. Die 16 einzelnen Bildstapel haben eine Größe von 424x424x320  $\mu\text{m}$  bei einem Z-Abstand von 5  $\mu\text{m}$ . 3D-Visualisierung mit Bitplane Imaris. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

### **3.4.9 Experimente mit Sondenvorschub ins Gehirn**

Zur Detektion oberflächlicher Tumoren wurden Tumorzellinjektionen wie oben beschrieben durchgeführt. Bei Experimenten mit Tumoren in tieferen Hirnregionen wurde die Injektionsnadel in Tiefen von 3, 4, 5 und 6 mm Tiefe eingeführt, ansonsten wurde die Tumordinjektion wie oben beschrieben durchgeführt. Experimente wurden zwischen 18 und 20 Tagen nach den Tumorzellinjektionen durchgeführt.

Jedes Tier wurde am Tag vor dem Eingriff zweiphotonenmikroskopisch untersucht, ob ein oberflächlicher Tumor vorhanden war. Tiere ohne oberflächliches Tumorstadium wurden für die Sondenvorschubexperimente ausgewählt. Drei Stunden vor dem Eingriff wurden den Tieren 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) in PBS-Lösung (Volumen 200-300 µl) zu je 20 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Zum Eingriff wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin anästhesiert, auf einem stereotaktischen Tisch mit Heizmatte fixiert, das Deckglas analog zur Tumorzellinjektion entfernt und das Gehirn der Maus zu jeder Zeit mit physiologischer Kochsalzlösung bedeckt. Ein Prototyp der endoskopischen Sonde wurde von Karl Storz zur Verfügung gestellt (Abb. 8). Zur Blutgefäßdarstellung wurden kurz vor den Aufnahmen 100-150 µl einer Kochsalzlösung von Indocyaningrün (ICG) zu je 0,3 mg/kg Körpergewicht in die Schwanzvene injiziert. Blutgefäßdarstellungen wurden ebenfalls mit Tieren ohne Tumor durchgeführt. Hierbei wurden konstant 100 µl Kochsalzlösung einer Konzentration von 10 mg/ml von FITC-Dextran 2 MDa oder 10 mg/ml Fluorescein Alcon in die Schwanzvene appliziert. Die Sonde wurde an einem Mikromanipulator (Luigs & Naumann) mit drei Achsen befestigt und mit einer Stellschraube langsam ins Gehirn abgesenkt. Die Detektion der Farbstoffe fand mittels einer 3-Chip CCD Kamera statt (Abb. 8).



**Abbildung 8: Endoskopische Fasersonde (Neurotax), Farbstoffe und Detektion**

A: Neue endoskopische Sonde im Größenvergleich mit konventioneller chirurgischer Mandrin und Hohlnadel, wie sie bei Tumorbiopsien verwendet werden.

B: Vergrößerung der Spitze eines Lichtleiterbündels der Sonde, Maßstabsbalken: 4 µm, mit freundlicher Genehmigung von Werner Goebel.

C: Emissionsspektren von Fluorescein, Protoporphyrin IX und Indocyaningrün in Blut mit den jeweils verwendeten Anregungswellenlängen. Spektren nach Spectra Viewer, Life Technologies; Stummer (1998); Akorn (ICG).

D: Sensitivität der 3-Chip CCD Kamera der Sonde. Die Detektion von blauen und infraroten Licht findet im selben Kanal (blau) statt.

### 3.4.10 Injektion von Farbstoffen

Fluoreszenzfarbstoffe (Abb. 9) wurden in Kochsalzlösung gelöst und in die Schwanzvene der Tiere injiziert. Eine Injektion von 100 µl Lösung mit einer Farbstoffkonzentration von 10 mg/ml erwies sich grundsätzlich als ausreichend, die Helligkeit variierte je nach Farbstoff. Injektionen wurden erst kurz vor den Aufnahmen durchgeführt. Die Mäuse befanden sich dabei bereits in der korrekten Position auf dem Mikroskoptisch fixiert. Während der Injektion wurde die Isofluranzufuhr auf 2% erhöht, um Schmerzen durch den Einstich zu vermeiden. Die Schwanzvenen dienen hauptsächlich der Temperaturregulation der Tiere. Eine Injektion war deshalb einfacher durchzuführen, wenn sich die Tiere bereits 5-10 Minuten auf einem Wärmekissen mit 37° C befanden. Isofluran wirkt ebenfalls leicht gefäßerweiternd und begünstigt eine erfolgreiche Injektion.

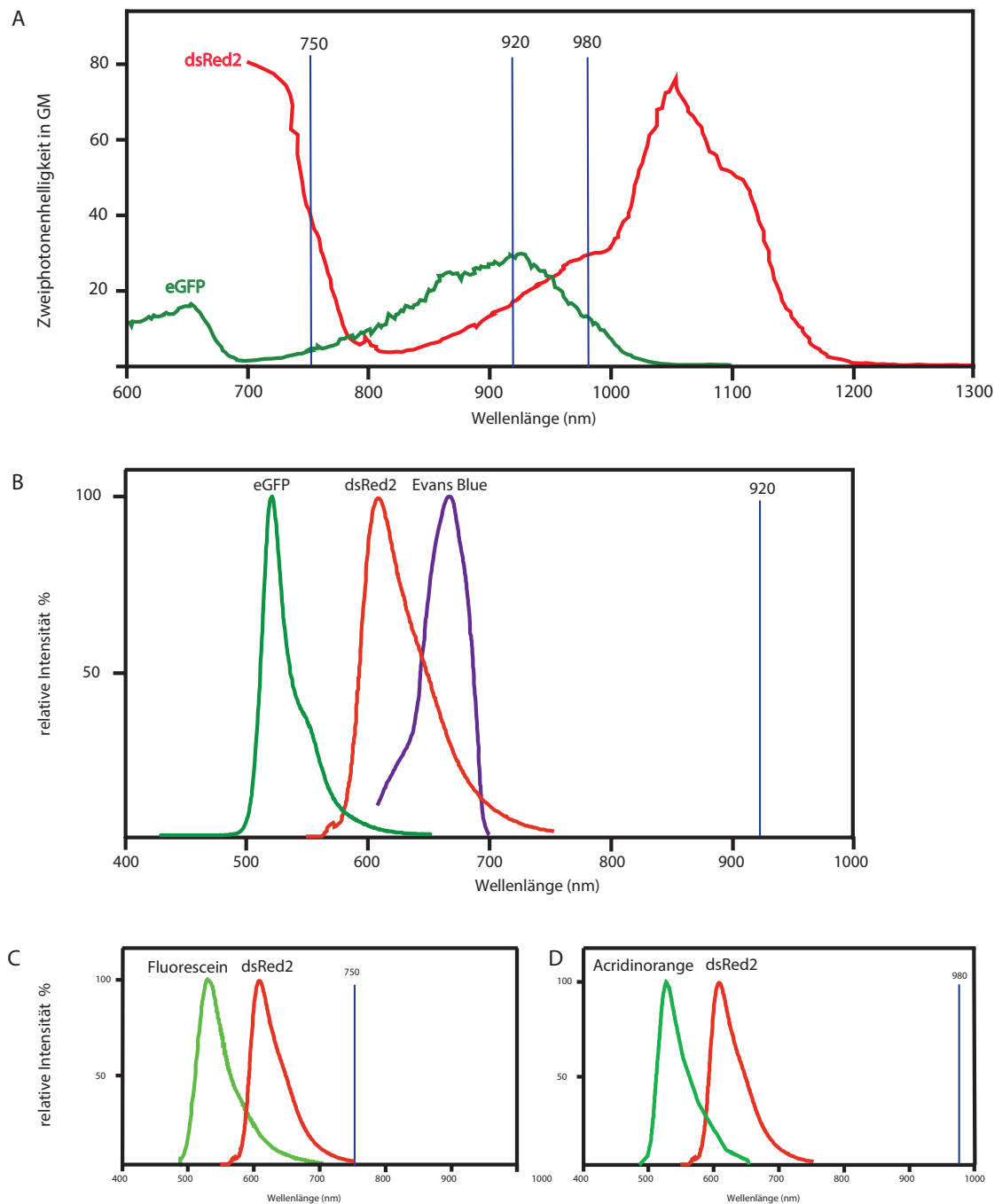
Zur Injektion von kostspieligen Substanzen (z.B. fluoreszenzmarkierte Antikörper) oder sehr exakten Mengen (bei der Permeabilitätsmessung), wurde den Tieren kurzzeitig ein provisorischer Schwanzvenenkatheter gelegt. Dabei wurde eine 0,3 x 12 mm Kanüle vom Sockel abgebrochen und in einem Polyethylenschlauch fixiert. Der Schlauch wurde mit Kochsalzlösung gefüllt und die Kanülenspitze in die Schwanzvene eingeführt. Eine korrekte Positionierung zeigte sich durch Blutrückfluss in den Schlauch. Der Katheter wurde mit Klebeband fixiert und die Spritze mit Farbstoff mit einer zweiten Nadel in die offene Seite des Schlauchs eingeführt. Ein 10 cm langer Schlauch hatte ein zusätzliches Totraumvolumen von 7,4 µl, das bei der Injektionsmenge berücksichtigt werden musste.

Acridinorange wurde in einer Konzentration von 3 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal eine Stunde vor der Untersuchung appliziert.

### Fluorophore

Fluorophor	Emission/Maximum	Herkunft
5-Aminolävulinsäure (5-ALA, Gliolan®)	Rot (Emission von Protoporphyrin IX)/635 nm	Medac, Wedel
Acridinorange	Grün/530 nm	Invitrogen, Darmstadt
Anti-c-met-Alexa 488	Grün/519 nm	Roche
Evans Blue	Rot, nah-infrarot/680 nm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA-Alexa 488	Grün/519 nm	Invitrogen, Darmstadt
dsRed2	Rot/582 nm	Clontech
eGFP	Grün/507 nm	Roger Tsien
FITC-Dextran 2 MDa	Grün/519 nm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FITC-Dextran 70 kDa	Grün/519 nm	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluorescein Alcon	Grün/519 nm	Alcon Pharma, Freiburg
Hoechst 33342	Blau/483 nm	Invitrogen, Darmstadt
Indocyaningrün (ICG-Pulsion)	Infrarot/839 nm	Pulsion Medical Systems, Feldkirchen
Texas Red Dextran 70 kDa	Rot/615 nm	Invitrogen, Darmstadt





**Abbildung 9: Zweiphotonanregungs- und Emissionsspektren**

A: Zweiphotonanregungsspektren von dsRed2 und eGFP in Geopert-Mayer (GM) Einheiten ( $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ photon}^{-1} \text{ s}$ ), nach Dobrizhev (2011). Zwei-Photonenanregung (blaue Linie) bei 750, 920 und 980 nm.

B: Emissionsspektren von eGFP, dsRed2 und Evans Blue, nach Dobrizhev (2011), Hed (1983). Zweiphotonanregung (blaue Linie) bei 920 nm.

C: Emissionsspektren von dsRed2 und Fluorescein, Zwei-Photonenanregung (blaue Linie) bei 750 nm, nach Spectra Viewer, Life Technologies. D: Emissionsspektren von dsRed2 und Acridinorange, Zwei-Photonenanregung (blaue Linie) bei 980 nm, nach Spectra Viewer, Life Technologies.

### 3.4.11 Applikation von therapeutischen Antikörpern und Zytostatika

Antiangiogene Antikörper gegen VEGF (RO5458522-000-007) und Angiopoietin-2 (RO5314193-000-008) wurden in 250 µl Kochsalzlösung (140 mM NaCl) in einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Die Antikörper repräsentieren IgG1 mit humanen Fc-Domänen und haben jeweils Kreuzreaktivität gegen humanes und murines VEGF bzw. Angiopoietin-2 (Kienast, 2013). Ab dem Beginn der Behandlung wurde die Applikation alle drei Tage bis zum Versuchsabbruch wiederholt. Kontrollgruppen wurde ebenso humanes Immunglobulin (Xolair, Novartis, humanisierter Antikörper gegen IgE) verabreicht. Irinotecan und Etoposid wurde zu jeweils 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal zweimal mit 6 Tagen Abstand verabreicht. Die Substanzen wurden zunächst in DMSO gelöst und dann 40 µl dieser Lösung mit 210 µl Natriumchloridlösung für eine Injektion verdünnt. Die Behandlung wurde zwei Tage nach Beginn der Antikörpertherapie begonnen.

## 3.5 Auswertungen

### 3.5.1 Bilderstellung, Bildanalyse und Quantifizierung

Dreidimensionale Bildstapel wurden in Imaris 7.5.1 (Bitplane) visualisiert und als Schnappschuss gespeichert. Messwerte und Ergebnisse wurden in Excel 2003 (Microsoft) festgehalten. Die Erstellung von Graphen und die statistische Auswertung erfolgte mit Graphpad 5.04 (Prism). Bildausschnitte wurde mit Photoshop CS4 (Adobe) ausgeschnitten. Standbilder von Videosequenzen wurden im VCL Player (VideoLAN Organization) als Schnappschuss der Bildschirmanzeige gespeichert. Filmausschnitte wurde mit Virtual Dub (Free Software Foundation) bearbeitet. Grafiken in Abbildungen wurden mit Illustrator CS4 (Adobe) erstellt. Zusammengesetzte Abbildungen wurden mit InDesign CS4 (Adobe) erstellt. Dreidimensionale Aufnahmen für Abbildungen wurden mit Autoquant dekonvuliert.

Zur Bestimmung der Blutflussgeschwindigkeiten wurden die Zeit/Ort Aufnahmen mit der LSM 510 Software (nur Vollversion, im Expert Mode starten) geöffnet. Zur Berechnung wurde im Modus „Display“ die xt-Darstellung ausgewählt, dort der Unterpunkt 2,5D verwendet. Über die Reiter „Show Image“ und „Show Table“ können im Bild rechtwinklige Koordinaten ausgezählt werden. Die Werte von Zeit und Position wurden über die Reiter „Time Slice“ und „Spot Slice“ abgefragt. Für jedes Gefäß wurden drei Zeit-Ort Koordinaten bestimmt und gemittelt. Veränderungen der Gefäßgrößen wurde mit Bitplane Imaris quantifiziert, dafür wurde aus jeweils zwei Regionen pro Tier mit der Rekonstruktionsmethode „Filament“ der Verlauf der Blutgefäße im grünen Kanal im Bereich des Tumors automatisch nachvollzogen. Fehlerhafte Rekonstruktion wurden manuell korrigiert. Zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität wurde die Intensität außerhalb von Blutgefäßen im Zeitverlauf mit ImageJ bestimmt. Gefäßvolumen und Gefäßoberfläche wurden mit der „Surface“ Methode in Imaris Bitplane abgeschätzt.

Die Gefäßpermeabilität  $P$  wurde wie zuvor beschrieben (Yuan et al., 1993; von Baumgarten et al., 2011) nach folgender Formale bestimmt:  $P = V/S * (1-h) * (1/I_0 * dI/dt + 1/k)$ .

Mit dem Gefäßvolumen  $V$ , der Gefäßoberfläche  $S$ , einem Hämatokrit  $h$  für Mäuse von 0,35, der Gesamtfluoreszenzintensität zu Beginn der Aufnahme  $I_0$ , der Zunahme der Intensität außerhalb



der Gefäße über die Zeit  $dI/dt$  und einer Zeitkonstante  $k$  von  $2,47 \times 10^3$  s (Yuan et al., 1993). Die Permeabilität wird in Volumen pro Fläche durch Zeit angegeben, als gekürzte Einheit verbleibt  $\text{cm/s}$ .

Zur Bestimmung der Mikroglia-dichte im Tumor wurden die aufgenommenen Bildstapel mit ImageJ geöffnet und drei optische Schnitte im Abstand von  $50 \mu\text{m}$  ausgezählt. Dafür wurde die größtmögliche Tumorfläche im roten Kanal gemessen und abgegrenzt. Dann wurde in diesem Bereich mit der Erweiterung „Cell Counter“ Mikrogliazellkörper markiert und gezählt. Für jedes Tier wurde für jeden Zeitpunkt der Mittelwert aus den drei Messungen bestimmt. Die Bestimmung der Acredinorange-positiven Zellen während des Chemotherapieversuches erfolgte ebenso.

### 3.5.2 Statistik

Die statistische Planung von Versuchen erfolgte mit Statmate 2 (Graphpad) oder R (R Foundation). Die statistische Analyse erfolgte mit Prism. Multiple Daten aus einem Tier sind als Mittelwerte der einzelnen Tiere angegeben,  $n$  bezieht sich dabei auf die Anzahl der Tiere. Fehlerbalken und Varianzen sind als Standardabweichung angegeben. Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden nach der Kaplan-Meier Methode dargestellt und berechnet. Zur Unterscheidung mehrerer Behandlungsgruppen bei der Bestimmung der Permeabilität wurde eine nichtparametrische ANOVA nach Kruskal-Wallis und Dunn's post-hoc Test, ansonsten eine ANOVA mit Tukey's post-hoc Test angewandt. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3.5.3 Software

Name	Hersteller	Verwendung
Adobe CS4	Adobe	Grafikerstellung, Bildbearbeitung
AutoQuant X2	Media Cybernetics	Bildbearbeitung
EMBL ImageJ	NIH, EMBL	Bildbearbeitung
Imaris 7.5.1	Bitplane	Bildbearbeitung
LSM Image Browser 4.2.0	Zeiss	Bildbearbeitung
LSM510	Zeiss	Bildbearbeitung
Office	Microsoft	Elektronische Datenverarbeitung
Prism5	Graphpad	Statistik
R	R Foundation	Statistik
StatMate 2	Graphpad	Statistik
Virtualdub	Free Software Foundation	Videobearbeitung
VCL Player	VideoLAN Organization	Videobearbeitung
ZEN2009	Zeiss	Bildbearbeitung, Mikroskopie



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Neurotax: Optische Unterstützung der molekularen Diagnostik in der Neurochirurgie

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte eine optische Sonde mit Techniken zur fluoreszenzbasierten Biopsie von Gehirntumoren getestet werden. Die Fluoreszenzmarkierung von Glioblastomen bei einer chirurgischen Resektion mittels 5-ALA induzierter PpIX-Fluoreszenz (Stummer et al., 2006) ist bereits in der Klinik etabliert und wird von vielen chirurgischen Zentren angewandt.

Um die Sicherheit der Stereotaxie soweit zu verbessern, dass sie auch in weniger spezialisierten Krankenhäusern zur Biopsie von Hirntumoren einsetzbar wird, sollte ein optisches System entwickelt werden, das Bildinformationen von der Spitze der Biopsienadel liefert. Durch Fluoreszenzfarbstoffe sollten Tumorgewebe, gesundes Gehirn und Blutgefäße unterschieden werden. Der Fokus des Projektes lag dabei auf der Entwicklung und Anwendung der optischen Systeme und nicht auf der Etablierung neuartiger Farbstoffe. Es war nötig auf bereits für die Diagnostik am Menschen zugelassene Fluoreszenzfarbstoffe zurückzugreifen, da die Kosten einer Zulassung neuer Substanzen zur Verwendung an humanen Patienten unmöglich bewältigt werden konnten.

Der Kooperationspartner Karl Storz GmbH hält die erforderlichen Patente DE 102 46 521 („Endoskop - zur Führung von Beleuchtungslicht und Bildübertragung in einem gemeinsamen Kanal“, auch: US 2005/0277810 A1 und EP 1 545 290 B1) und DE 102005 022 608 B3 (US 2006/0256544 A1, EP 1 721 635 A2: „Lichtsystem zur photodynamischen Diagnose und/oder Therapie“). Die Entwicklung einer miniaturisierten faserbasierten optischen Sonde wurde vom Kooperationspartner Karl Storz GmbH durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung der Sonde zur Verwendung mit Fluoreszenzfarbstoffen im Mausmodell von Gehirntumoren getestet.

Die Markierung des Tumors sollte mittels 5-Aminolävulinssäure (5-ALA, Gliolan®) durchgeführt werden. Die Fluoreszenz basiert auf 5-ALA-induziertem Protoporphyrin IX (PpIX). 5-ALA ist eine Vorstufe des Protoporphyrin IX in der Häm-Synthese, welches sich in Tumorzellen deutlich stärker anreichert als in gesunden Körperzellen. 5-ALA wird physiologisch aus Glycin und Succinyl-Coenzym A gebildet. Die Gabe von überschüssigen 5-ALA führt zu einer Akkumulation von PpIX in Tumorzellen. Die limitierende enzymatische Reaktion ist die Konversion von PpIX und zweiwertigen Eisen zum Häm durch die Ferrochelatase. Viele maligne Neoplasien haben eine reduzierte Aktivität der Ferrochelatase (Peng, et al., 1997). Ebenfalls relevant ist eine erhöhte Aktivität der Porphobilinogen Deaminase, die zu einer verstärkten Produktion eines Vorläufers von PpIX führt. Gliolan® wird bereits in der fotodynamischen Therapie und der chirurgischen Resektion von Gliomen angewendet und ist in der Klinik zugelassen. PpIX hat eine starke Absorption zwischen 380 nm und 420 nm und emittiert Licht zwischen 460 nm und 750 nm mit zwei charakteristischen Maxima im roten Spektrum, bei 635 und 704 nm. (Stummer et al., 1998). Zur Darstellung der Blutgefäße sollte Indocyaningrün (ICG) verwendet werden. ICG-Pulsion® ist als Diagnostikum für Herz-, Kreislauf- und Mikrozirkulationsdiagnostik,

Leberfunktionsdiagnostik und für ophthalmologische Angiographien zugelassen. ICG ist ein im nahinfraroten Bereich fluoreszierender Farbstoff, mit einem Absorptionsmaximum von 800 nm und einem Emissionsmaximum von 830 nm. Nach intravenöser Applikation ist ICG an Blutplasmae Proteine gebunden und wird rasch mit einer Halbwertszeit von 3-4 Minuten über die Leber und Gallenflüssigkeit ausgeschieden. Zweiphotonenanregung von ICG ist bei 1550 nm beschrieben, allerdings ist die Wasserabsorption in diesem Wellenlängenbereich sehr hoch (Murari et al., 2011). Abgesehen davon sind zum Zeitpunkt dieser Arbeit kommerziell erhältliche Zweiphotonensysteme nicht in diesem Wellenlängenbereich verwendbar.

Als Alternative zu ICG stand auch das Natriumsalz des Fluoresceins zur Verfügung. Unter dem Namen Fluorescein Alcon® ist es ebenfalls als Diagnostikum zu Angiographien des Auges zugelassen. Fluorescein hat in der präklinischen Forschung darüber hinaus eine besondere Relevanz, da es (oder dessen kommerzielle Derivate wie Alexa 488) als Fluoreszenzfarbstoff bei molekularbiologischen Mikroskopietechniken angewendet wird. Fluorescein wird auch häufig an Dextrane gekoppelt. Niedrigmolekulare Dextranlösungen (Größen von 40-60 kDa, z.B. Deltadex 60) werden in der Chirurgie als intravenöse Thromboseprophylaxe eingesetzt. Hochmolekulare fluoreszenzmarkierte Dextrane (200-2000 kDa) eignen sich besser zur austrittsfreien Blutgefäßdarstellung in präklinischen Modellen, werden jedoch im Menschen nur langsam von der Niere ausgeschieden und nicht in der Klinik verabreicht.

Die Eignung der Methodik zur Anwendung an Tumorpatienten sollte in einem Mausmodell eines Glioblastoms erprobt werden. Hierfür wurden immundefiziente Nacktmäuse und die humane Glioblastomzelllinie U87-GFP verwendet.

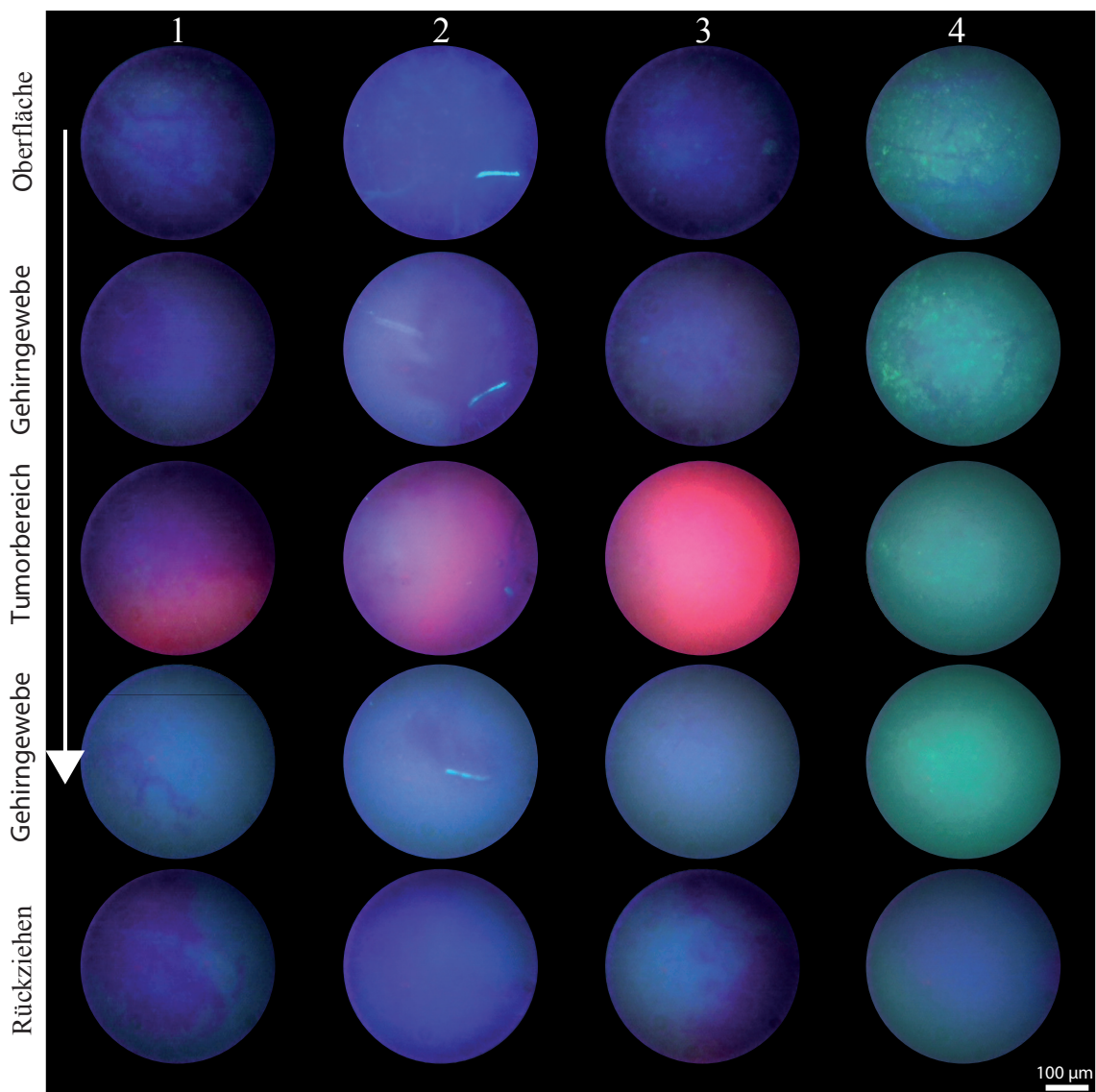
Wesentliche Ziele waren die Darstellung von Gehirntumoren durch eine endoskopische Sonde mittels PpIX-Fluoreszenz, sowie die Darstellung von Blutgefäßen des Gehirns mit einer endoskopischen Sonde mittels Indocyaningrün- oder Fluorescein-Fluoreszenz. Eine überzeugende Demonstration der Funktionalität im Mausmodell ermöglichte die erstmalige Anwendung der Methodik zur Biopsie eines humanen Glioblastompatienten.

Die Neuerung der hier durchgeführten Experimente wurde durch die Entwicklung einer miniaturisierten endoskopischen Sonde zur Fluoreszenzbildgebung vom Projektpartner Karl Storz GmbH ermöglicht. Mit dieser Sonde sollten Tumorzellen und Blutgefäße während einer Biopsie über Fluoreszenzsignale vom umgebenden Gewebe unterschieden werden.

Die Funktionalität der Sonde wurde bereits zuvor von den Projektpartnern in artifiziellen Gefäßphantomen bestätigt. Die Beschaffenheit des Gehirns und seiner Blutgefäße, insbesondere innerhalb eines Tumors lässt sich jedoch nicht ausreichend in einer Simulation darstellen. Deshalb war die Erprobung des Systems an einem tierexperimentellen Modell unerlässlich. Es war zu Beginn des Projekts völlig unklar, ob eine endoskopische Fluoreszenzdarstellung von Strukturen während eines Vorschubs ins Gehirn überhaupt möglich ist oder ob durch Blut und Gewebereste die Miniatursonde verklebt und überhaupt kein Signal detektierbar ist.

#### 4.1.1 Sondenbasierte Detektion von Glioblastomen im Mausmodell durch 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenz

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass oberflächlich im Gehirn implantierte U87-GFP Glioblastomzellen nach intraperitonealer 5-ALA Gabe rote PpIX Fluoreszenz aufweisen. Das verwendete Miniaturfaserendoskop war in der Lage, diese Fluoreszenz im roten Kanal zu detektieren, es trat keine Überlappung mit dem GFP-Signal auf. Zur endoskopischen Darstellung von Glioblastomen wurden 20 Nacktmäusen in einer Tiefe zwischen 3 und 5 mm U87-GFP-Tumore implantiert. Nach drei Wochen wurden die Gehirne aller Tiere durch ein



**Abbildung 10: Vorschub der endoskopischen Neurotax-Sonde ins Mäusegehirn**

Repräsentative Aufnahmen aus 4 Tieren (3 mit Tumor) beim Vorschub der Neurotaxsonde ins Gehirn. Alle Tiere erhielten 5-ALA und ICG. Tiere 1 bis 3 zeigen eine deutliche rote Fluoreszenz im Bereich des Tumors jedoch nicht darüber oder darunter. Tier 4 (ganz rechts) trägt keinen Tumor und zeigt auch keine rote Fluoreszenz. Die Blaufluoreszenz in den meisten Bildern stammt von austretendem ICG durch verletzte Kapillaren. Es waren in der Regel mehrere Vorschübe notwendig um auf die Position des Tumors zu stoßen. Im Kontrolltier ist der erste Vorschub gezeigt, deshalb ist die Blaufärbung zunächst etwas geringer und nur grünliche Autofluoreszenz des Gehirns zu sehen. Erst beim Rückzug tritt eine starke Blaufärbung durch Blutungen auf. Blutgefäße durch ICG-Färbung konnten oberflächlich nur schwach, beim Vorschub gar nicht erkannt werden.

kranielles Fenster zweiphotonenmikroskopisch auf oberflächliche Tumore untersucht. Tiere mit oberflächlichen Tumoren wurden aussortiert, Tiere ohne sichtbaren oberflächlichen Tumor wurden für die Sondenversuche ausgewählt. Drei Stunden nach intraperitonealer 5-ALA Injektion wurde das Deckglas des kranialen Fensters entfernt und die Sonde langsam ins Gehirn der Tiere vorgeschoben. Abbildung 10 zeigt Vorschübe aus  $n = 3$  verschiedenen Tieren mit Tumoren. Gesundes Gewebe an der Gehirnoberfläche zeigt Autofluoreszenz im grünen Kanal, bei intravenöser Applikation von Indocyaningrün (ICG) auch bläulich. In den tiefer liegenden Schichten konnte bei Erreichen des Tumors ein deutliches rotes Signal detektiert werden. Unterhalb des Tumors verschwand das rote Signal und es wurde erneut lediglich Autofluoreszenz im grünen und blauen Kanal detektiert. Nach dem Eingriff wurden die Tiere euthanasiert, die Gehirne entnommen und das Vorhandensein eines Tumors bestätigt. Als Kontrollen wurden Tiere ohne implantierten Tumor verwendet, hier konnte auch in tieferen Regionen kein rotes Fluoreszenzsignal detektiert werden.

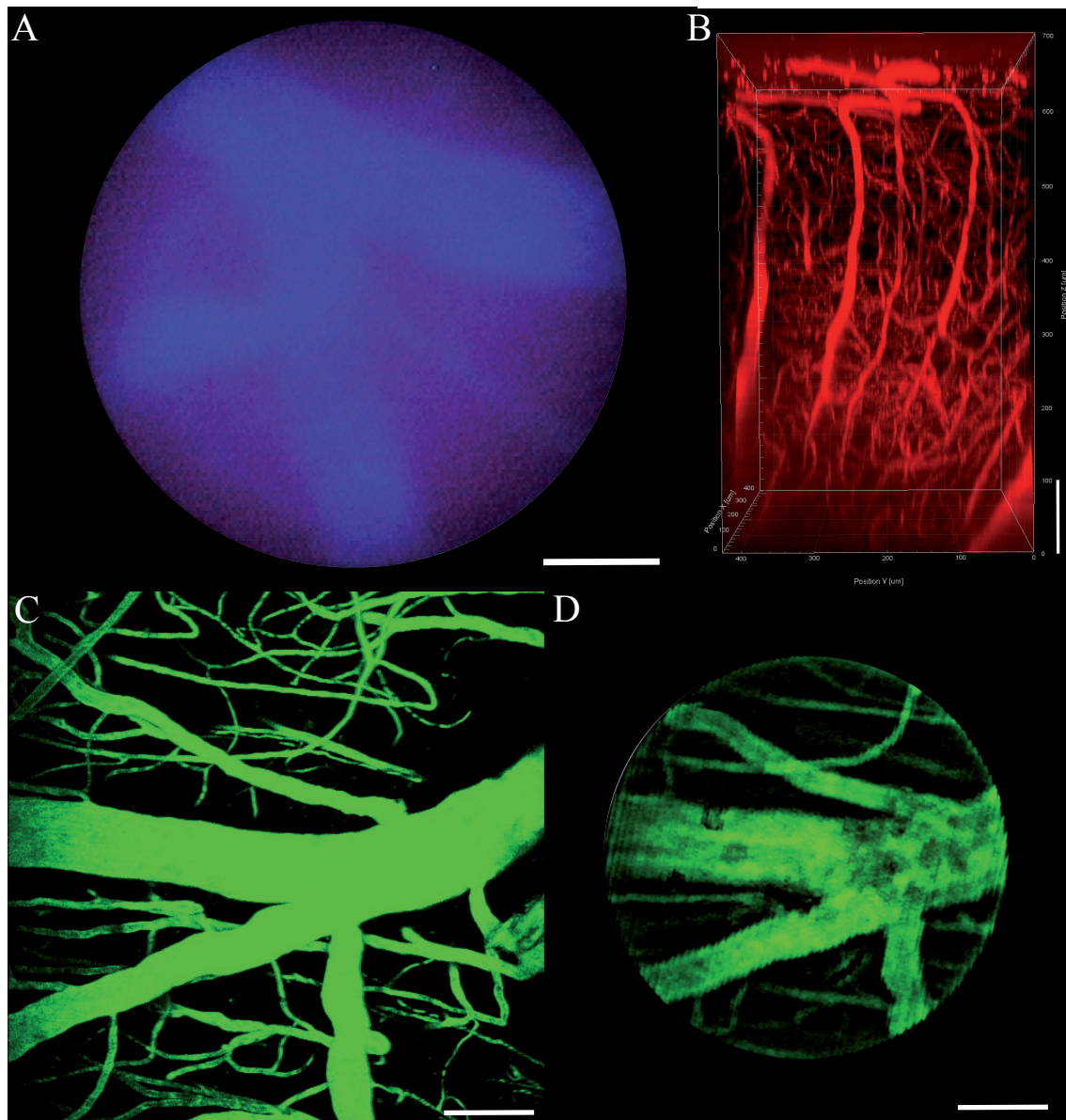
#### **4.1.2 Sondenbasierte Darstellung von Blutgefäßen des Gehirns durch ICG oder Fluorescein**

Weiterhin sollten Möglichkeiten zur Darstellung und frühzeitigen Erkennung von Blutgefäßen des Gehirns erprobt werden. Zunächst wurde die Darstellung von ICG nach intravenöser Applikation in Blutgefäßen der Gehirnoberfläche untersucht. Größere Gefäße zeigten eine helle Fluoreszenz im blauen Kanal, allerdings war der Kontrast insgesamt recht schwach, was vor allem auf den erheblichen Hintergrund im Gewebe zurückzuführen ist (Abb. 11).

Parallel zur Detektion tiefer Tumoren mit 5-ALA wurde auch während des Vorschubs der Sonde versucht, Blutgefäße durch ICG darzustellen, allerdings ohne Erfolg. Hierbei sollte allerdings erwähnt werden, dass im Mäusegehirn der Großteil der großen Gefäße an der Oberfläche parallel, in der Tiefe jedoch senkrecht zur Oberfläche verläuft (Abb. 11B). Die Wahrscheinlichkeit, beim Vorschub der Sonde auf ein großes, quer verlaufendes Gefäß zu stoßen, ist damit eher gering. Deshalb wurden weitere Versuche zur Detektion von Blutgefäßen in Tieren ohne Tumoren durchgeführt.

Zunächst wurde an oberflächlichen Gefäßen überprüft, ob die Sonde in der Lage ist sämtliche Gefäße darzustellen, einschließlich kleinster Kapillaren. Hierfür wurde als Farbstoff Dextran-gekoppeltes FITC (2 MDa) verwendet. Um die Auflösung zu erhöhen, wurde die Sonde mit einer GRIN-Linse mit zweifacher Vergrößerung ausgerüstet. Eine oberflächliche Region mit einem leicht wiederauffindbarem großen Blutgefäß wurde zweiphotonenmikroskopisch durch das kraniale Fenster aufgenommen. Nachdem das Fenster behutsam entfernt wurde, konnte diese Region mit der Sonde dargestellt werden. Sowohl große Gefäße, als auch kleine Kapillaren konnten mit der Sonde ebenso dargestellt werden wie mit dem hochauflösenden Zweiphotonenmikroskop (Abb. 11).





**Abbildung 11: Oberflächliche endoskopische Darstellung von Gefäßen mit ICG und Fluorescein**

Hier wurde versucht, Gefäße zunächst nur an der Oberfläche des Gehirns darzustellen, um die Möglichkeiten der Sonde zur Gefäßdarstellung mit ICG oder Fluorescein auszutesten.

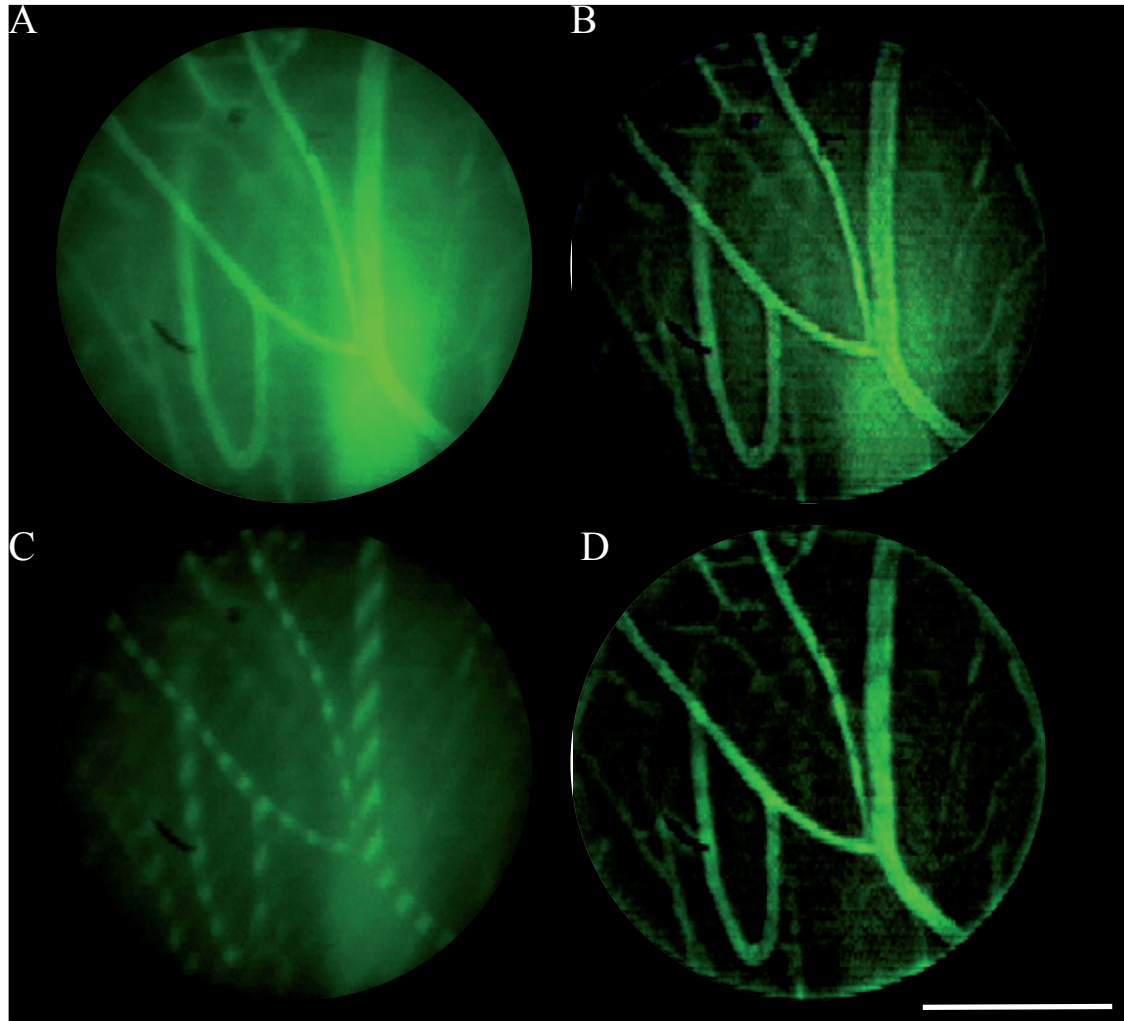
A: Großes, oberflächliches Gefäß nach ICG-Injektion, endoskopische Darstellung.

B: Die meisten großen Gefäße im Kortex verlaufen senkrecht zur Oberfläche, die Chance mit einer Sonde auf ein waagrecht verlaufendes Gefäß zu treffen ist eher gering; abgebildet ist eine zweiphotonenmikroskopische, seitliche Darstellung eines 700 µm tiefen Stapels durch ein kranielles Fenster nach Evans Blue-Injektion (rot/nahinfrarote Fluoreszenz).

C: Oberflächliche Gefäße nach Fluorescein-Dextran (2 M)-Injektion. Zweiphotonenmikroskopische Projektion eines 50 µm Stapels, aufgenommen durch ein kranielles Fenster.

D: Die Region aus C mit dem Endoskop aufgenommen. Nach der Zweiphotonenmikroskopie wurde das Deckglas des kraniellen Fensters vorsichtig entfernt und die Region anhand des großen Gefäßes lokalisiert. Auch kleine Gefäße sind mit der Sonde ebenso wie in C darstellbar. Maßstabsbalken 100 µm.

Weitere Bildverbesserungstechniken, die zur Erhöhung der Bildqualität in Echtzeit eingesetzt wurden, waren ein Gauß-Filter und strukturierte Beleuchtung (Abb. 12). Der Gauß-Filter reduzierte das Hintergrundrauschen und erleichterte die Betrachtung des Bildsignals erheblich. Die strukturierte Beleuchtung erzielte ebenfalls eine deutliche Verbesserung des Signals in der Fokusebene, allerdings auf Kosten des Signals unterhalb der Fokusebene.

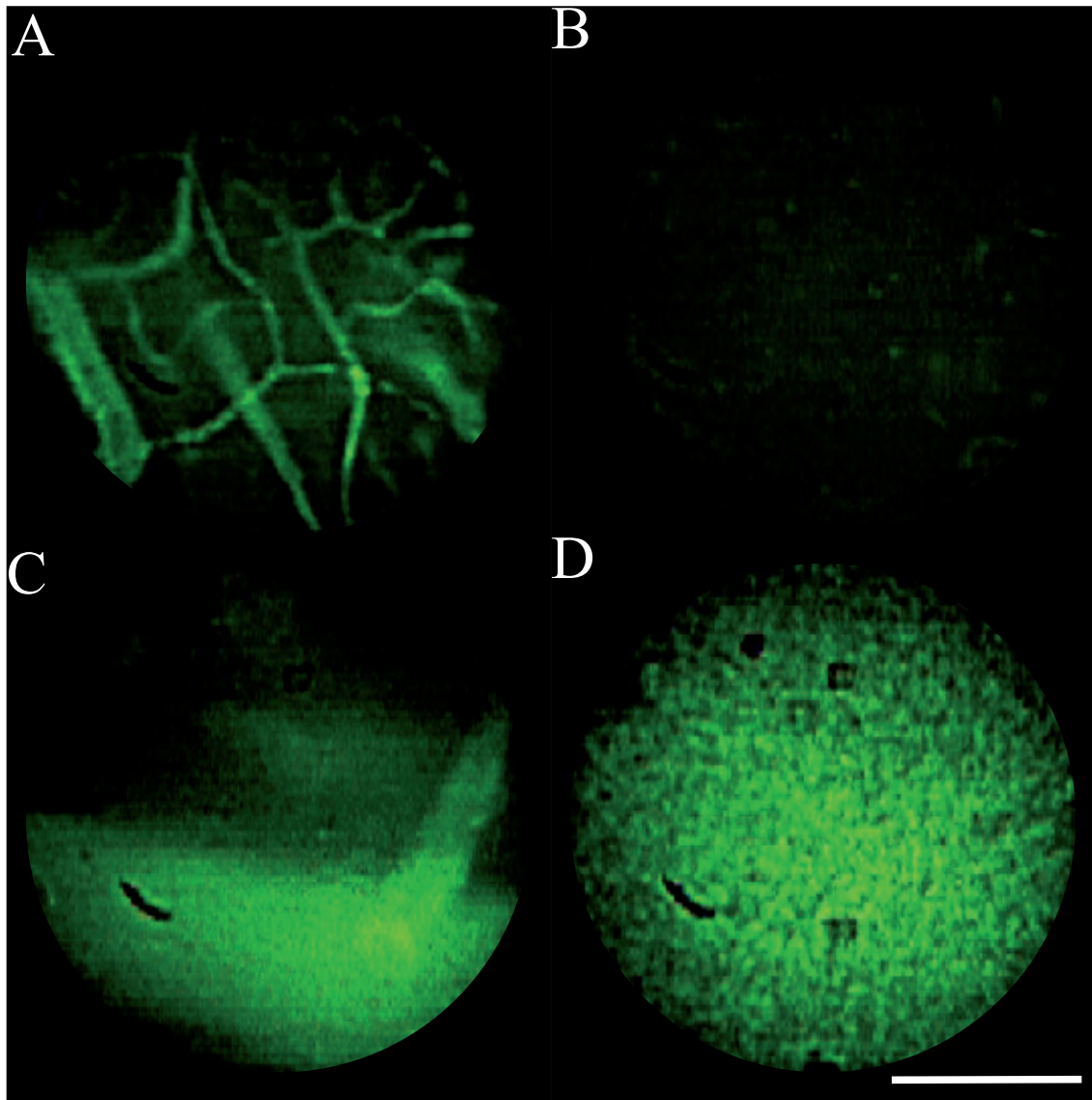


**Abbildung 12: Bildverbesserungstechniken bei der Blutgefäßdarstellung mit 2x-GRIN-Linse**

A: Oberflächliche Gefäße nach Injektion von Fluorescein-Dextran (2 MDa).  
 B: Mit Gauß-Filtertechnik, gefiltert aus A, die Darstellung in Echtzeit mit Gauß-Filter erleichtert die Betrachtung.  
 C: Streifenmuster der strukturierten Beleuchtung, parallel zu A aufgenommen.  
 D: Ergebnisbild aus C, Gefäße in der Fokusebene sind deutlich klarer, das große Gefäß unter der Fokusebene deutlich schwächer. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$



Schließlich wurde noch bei  $n = 3$  Tieren versucht, ein Blutgefäß in der Tiefe durch das Fluoreszenzsignal von FITC-Dextran (2 MDa) zu detektieren. In einem Tier konnte ein großes Gefäß beim Vorschub vorzeitig erkannt werden (Abb. 13). Es blieb ausreichend Zeit den Vorschub der Sonde zu stoppen und das Gefäß zu betrachten, ohne es zu zerstören. Ein weiterer Vorschub der Sonde zerstörte das Gefäß und führte durch starke Blutungen zu einem starken Hintergrund, der die weitere Bildgebung verhinderte.



**Abbildung 13: Sondenvorschub im gesunden Gehirn zur Gefäßerkennung mit Fluorescein**

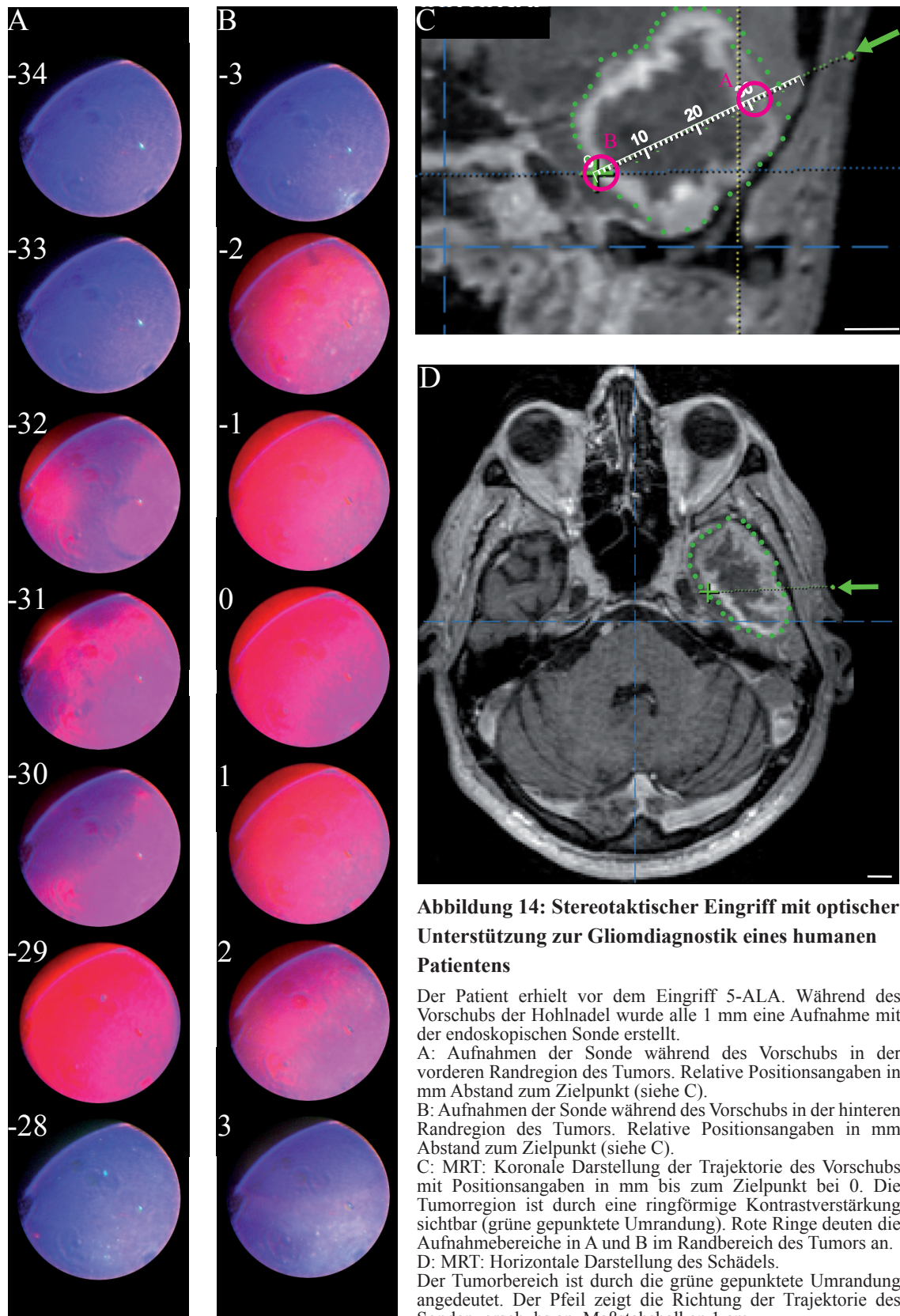
A: Oberflächliche Blutgefäße sind deutlich erkennbar.  
B: Beim Vorschub sind keine kleinen Gefäße sichtbar.  
C: Detektion eines tiefliegenden großen Gefäßes.  
D: Starkes Signal nach Zerreißen des Gefäßes.  
Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.3 Fluoreszenzgestützte stereotaktische Biopsie am Glioblastompatienten

Aufgrund der positiven Ergebnisse im Mausmodell war eine erstmalige Anwendung der Methodik bei der Biopsie eines Gliompatienten gerechtfertigt. Der Eingriff wurde von Prof. Dr. Kreth in der Neurochirurgie des Klinikums der LMU in Großhadern durchgeführt. Ein Patient mit Verdacht auf einen Tumor im vorderen linken Temporallappen eignete sich aufgrund der Lage des Tumors für den Eingriff (Abb. 14). Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung des Patienten wurde der Eingriff aus rechtlichen Gründen als individueller Heilversuch durchgeführt. Es wurde lediglich die Markierung des Tumors durch orale Gabe von 5-ALA (20 mg/kg Körpergewicht) 6 Stunden vor dem Eingriff angewandt. Eine Blutgefäßmarkierung wurde nicht vorgenommen. Die Verwendung der Sonde anstelle der konventionellen Mandrin beeinflusste den Eingriff nicht negativ. Abbildung 14 C/D zeigt die Trajektorie des Vorschubs der Nadel anhand der stereotaktischen Planung. Die Magnetresonanztomographie (MRT) zeigt eine ringförmige Kontrastverstärkung von etwa 3 cm Durchmesser. Das Bild der Sonde an der jeweiligen Position des Vorschubs in Relation zum Zielpunkt der stereotaktischen Planung ist in Abbildung 14 A und B dargestellt. Zu Beginn des Vorschubs zeigte die Sonde nur bläuliche Autofluoreszenz. Im Bereich der ringförmigen Kontrastverstärkung (Position -32) konnte erstmals eine deutliche rote Fluoreszenz beobachtet werden. Das rote Signal verschwand im vermuteten nekrotischen Kern des Tumors (Position -28) und erschien erst wieder am anderen Rand des Tumors, in der Zone der ringförmigen Kontrastverstärkung (Position -2). Der Vorschub wurde gestoppt nachdem das Signal wieder verschwand (Position +3).

Zur Korrelation des Fluoreszenzsignals wurden von relevanten Positionen Gewebeproben zur Histologie entnommen und nach einer Färbung mit Hämatoxylin und Eosin von einem Neuropathologen untersucht (Abb. 15). Es wurde eine Probe im gesunden Gewebe vor dem Tumor (-33) entnommen, eine im Bereich der Kontrastverstärkung (-31), zwei Proben am inneren Rand der Kontrastverstärkung (-27 und -3) und zwei Proben von der weiter entfernten Kontrastverstärkung (-2 und +1). Die histologischen Schnitte zeigten gesundes Gewebe im signalfreien Bereich vor dem Tumor (-33) und vitales Tumorgewebe mit erhöhter Zellzahl beim Anstieg der Fluoreszenz im Bereich der Kontrastverstärkung (-31). Die Bereiche im Kern des Tumors (-27 und -3) zeigten kein Fluoreszenzsignal und waren nekrotisch. Weitere Proben mit positiver Fluoreszenz am anderen Randbereich der Kontrastverstärkung zeigten ebenfalls vitales Tumorgewebe. Der Befund aufgrund der Histologie und molekularen Diagnostik von Frau Dr. Eigenbrod ergab ein Glioblastoma multiforme.

Zusammenfassend zeigte die histologische Unterscheidung von gesundem Gewebe, vitalem Tumorgewebe und Nekrose eine klare Korrelation mit dem Fluoreszenzsignal der PpIX-Färbung des Tumorbereichs.



**Abbildung 14: Stereotaktischer Eingriff mit optischer Unterstützung zur Gliomdiagnostik eines humanen Patienten**

Der Patient erhielt vor dem Eingriff 5-ALA. Während des Vorschubs der Hohlneedle wurde alle 1 mm eine Aufnahme mit der endoskopischen Sonde erstellt.

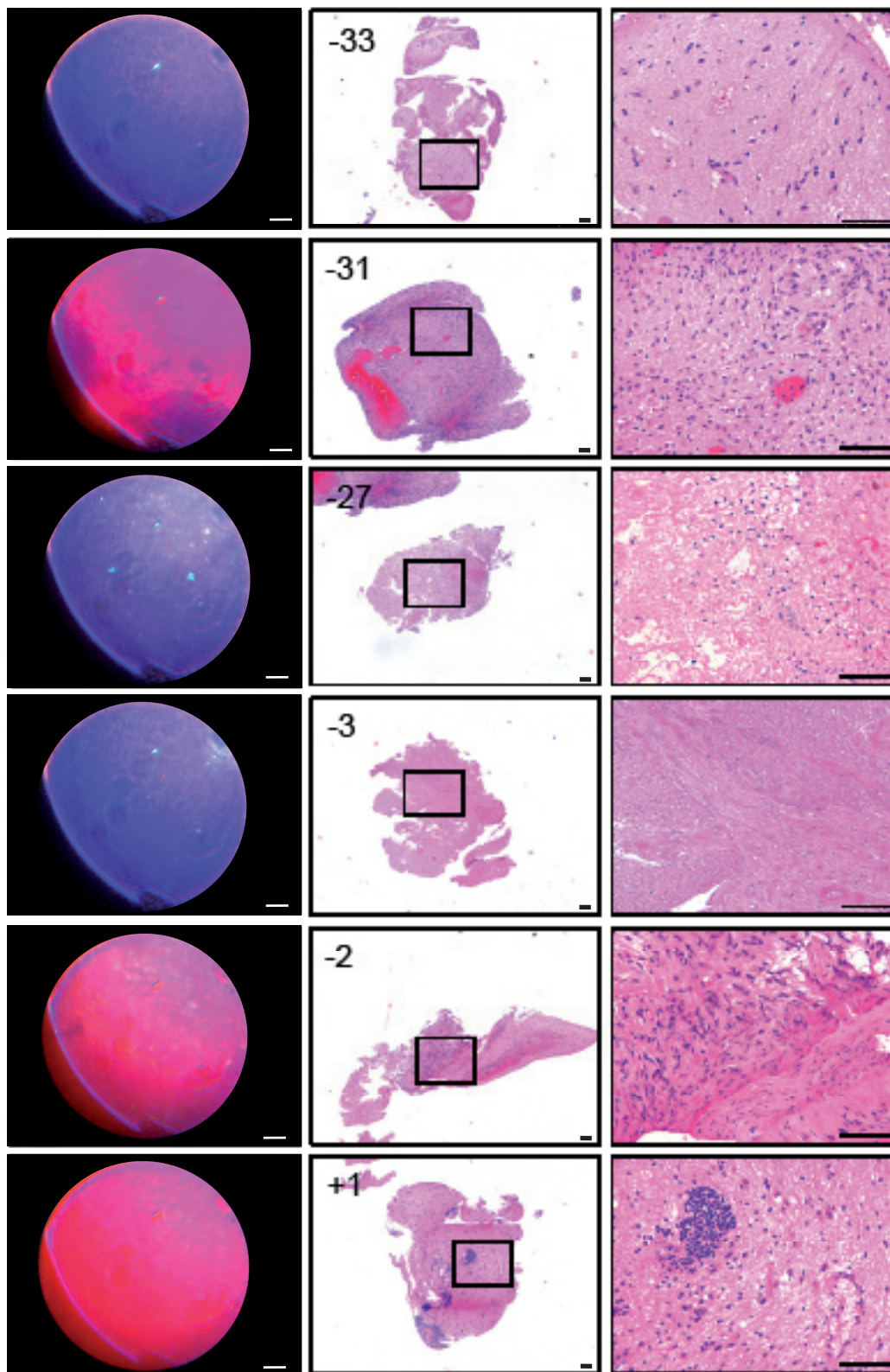
A: Aufnahmen der Sonde während des Vorschubs in der vorderen Randregion des Tumors. Relative Positionsangaben in mm Abstand zum Zielpunkt (siehe C).

B: Aufnahmen der Sonde während des Vorschubs in der hinteren Randregion des Tumors. Relative Positionsangaben in mm Abstand zum Zielpunkt (siehe C).

C: MRT: Koronale Darstellung der Trajektorie des Vorschubs mit Positionsangaben in mm bis zum Zielpunkt bei 0. Die Tumorregion ist durch eine ringförmige Kontrastverstärkung sichtbar (grüne gepunktete Umrandung). Rote Ringe deuten die Aufnahmebereiche in A und B im Randbereich des Tumors an.

D: MRT: Horizontale Darstellung des Schädels. Der Tumorbereich ist durch die grüne gepunktete Umrandung angedeutet. Der Pfeil zeigt die Richtung der Trajektorie des Sonden-Vorschubs an. Maßstabsbalken 1 cm.





**Abbildung 15: Vergleich des PpIX-Sondensignals mit der Histologie**

Korrelation der PpIX Fluoreszenz (links) während der Biopsie mit allen Positionen, denen histologische Proben entnommen wurden. Hämatoxylin-Eosin-Färbung färbt Zellkerne blau und Zellplasma rötlich. -33: typisches Erscheinungsbild im gesunden Gehirngewebe; -31: Tumorgewebe zeigt erhöhte Zellzahl anhand der blauen Zellkerne; -27: Nekrose, erkenntlich anhand weniger oder fehlender Zellkerne ; -3 erneut Nekrose, Zellkerne fehlen völlig; -2: Tumor mit erhöhter Zellzahl; +1: Tumor mit erhöhter lokaler Makrophagendichte. Histologie mit freundlicher Genehmigung von Dr. Sabina Eigenbrod. Maßstabsbalken: 100 µm.





#### **4.2 Antiangiogene Therapie von Gehirnmastasen: Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Dynamik der vaskulären Normalisierung durch Inhibition von VEGF und Angiopoietin-2**

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die dynamischen Effekte einer antiangiogenen Behandlung von Gehirnmastasen im Mausmodell mit kraniellen Fenstern untersucht werden. Im Tiermodell wurden die humane Lungenkarzinomzelllinie PC-14PE6 orthotop ins Gehirn von immundefizienten Nacktmäusen implantiert. Als pharmakologische Ziele wurden VEGF-A und Angiopoietin-2 durch Antikörper inhibiert. Im Vergleich zu gewöhnlichen Studien, bei denen in der Regel nur der Endpunkt histologisch untersucht wird, bieten Versuche mit chronischen kraniellen Fenstern Daten von multiplen Zeitpunkten aus ein und demselben Tier. Deshalb ist diese Art von Versuchen von besonderem Wert für die Untersuchung von dynamischen, transienten Veränderungen während antiangiogener Behandlungen. Die Versuche sind in vier Teilvorhaben unterteilt: Im ersten Teil wurden Tumorwachstum, Überleben, Gefäßparameter und Blutfluss für die Einzelgruppen und die Kombination der Antikörper untersucht. Im zweiten Teil wurde ebenso die Gefäßpermeabilität von Fluorescein-gekoppeltem Dextran (70 kDa) bestimmt. Im dritten Teil wurde die Kombination der zwei antiangiogenen Antikörper mit einer Chemotherapie aus Irinotecan und Etoposide untersucht. Neben dem Tumorwachstum und dem Gesamtüberleben wurde die Verteilung von Acridinorange im Tumor untersucht. Im vierten Teil wurden beide Antikörper gemeinsam auf eine Wirkung auf Mikroglia und Makrophagen im Tumor untersucht. Diese Reihe wurde in doppelt transgenen Tieren einer Kreuzung von Nacktmäusen mit der *Cx<sub>3</sub>cr1*-Linie durchgeführt.

Alle Therapieversuche wurden mit einer geringen Dosis der Antikörper durchgeführt, 5 mg pro kg Körpergewicht alle drei Tage. Kombinationsgruppen erhielten ebenso von beiden Antikörpern jeweils 5 mg pro kg Körpergewicht.

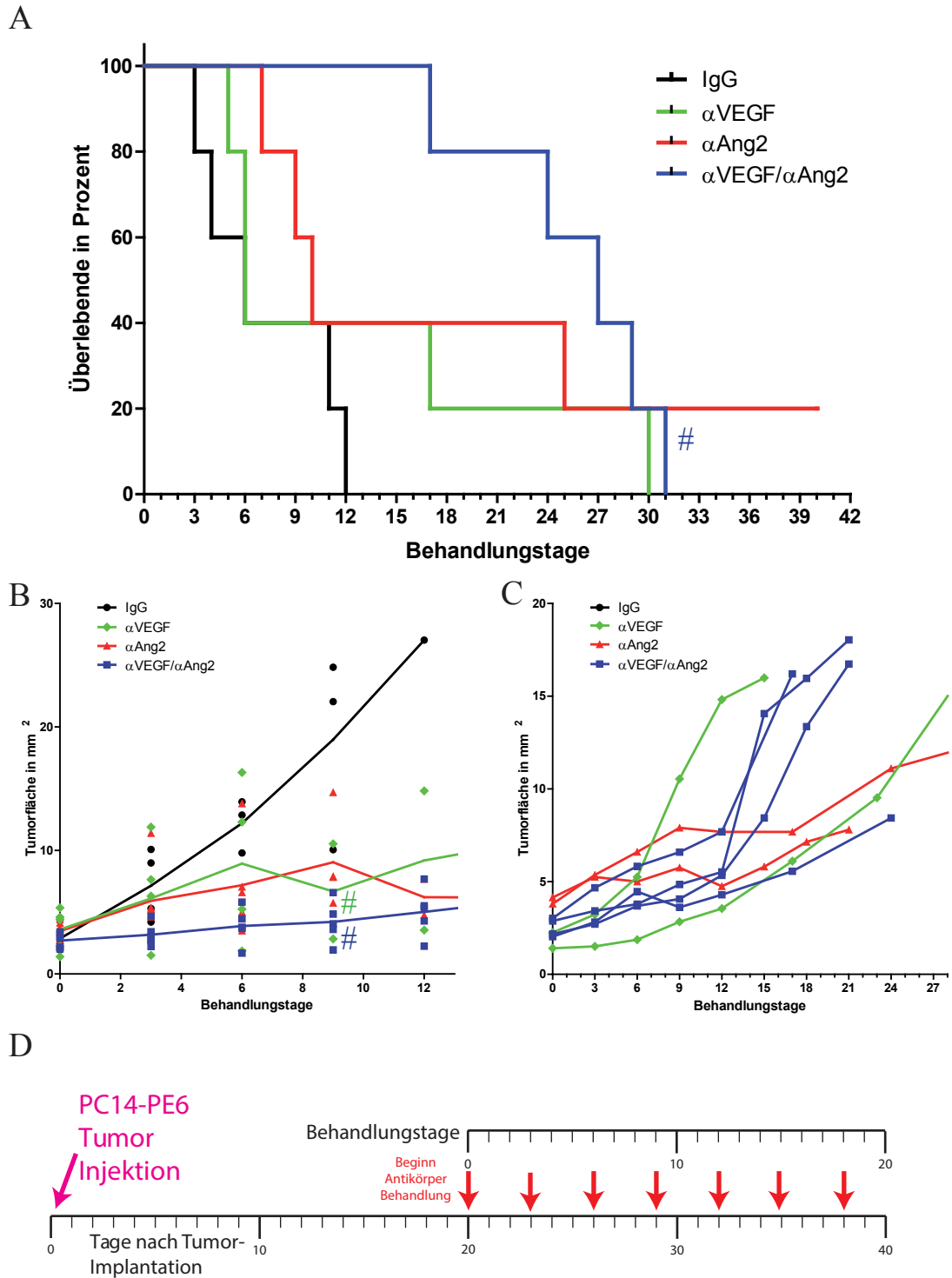
#### 4.2.1 Analyse von Überlebenszeit und Tumorwachstum nach Inhibition von VEGF und Angiopoietin-2

In der ersten Versuchsreihe wurden vier Versuchsgruppen mit je  $n = 5$  Tieren verglichen: Die Kontrollgruppe erhielt lediglich unspezifische IgG-Antikörper, die drei Behandlungsgruppen nur anti-VEGF, nur anti-Angiopoietin-2, sowie anti-VEGF mit anti-Angiopoietin-2 zusammen.

Tumorgröße und Überlebenszeit sind die konventionellen Messgrößen bei der Analyse von Wirkstoffen in präklinischen Tumormodellen.

Der Verlauf des Tumorwachstums verläuft bei unbehandelten Tieren grob wie folgt: In der ersten Woche nach der Injektion ist nur eine sehr geringe Zunahme zu beobachten, der Tumor hat im Wesentlichen die Größe der ursprünglichen Injektionsstelle. Zwischen 10 und 20% der Versuchstiere zeigen kein Tumorwachstum, in diesen Fällen waren nach 5-14 Tagen sämtliche Tumorzellen verschwunden. Ein vollständiges Verschwinden der Tumorzellen konnte zu einem späteren Zeitpunkt nicht beobachtet werden. Von Tag 7 bis 14 beginnen die Tumore stärker zu wachsen, mit etwa  $50 \mu\text{m}$  pro Tag. Die Therapie der Tiere wurde begonnen, wenn eine Seite des Tumors einen Durchmesser von  $1,5 \text{ mm}$  erreicht hatte (Abb. 16, Behandlungsbeginn und Mikroskopiezeitpunkt Tag 0). Dies wurde im Mittel nach 20,3 Tagen erreicht (minimal 17, maximal 22 Tage). Nicht therapierte, das heißt nur mit unspezifischem IgG behandelte Tiere erreichen den Versuchsendpunkt wenige Tage nach Behandlungsbeginn (Median 5,0 Tage, Mittel 7,2 Tage). Tiere in der Gruppe der anti-VEGF-Monotherapie zeigten ein mittleres Überleben von 12,8 Tagen (Median 6 Tage). Tiere in der Gruppe der anti-Angiopoietin-2-Behandlung überlebten im Mittel 18,2 Tage (Median 10 Tage). Tiere, die sowohl anti-VEGF als auch anti-Angiopoietin-2 Antikörper erhielten, überlebten im Mittel 25,6 Tage (Median 27 Tage). Die Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den mit anti-VEGF als auch anti-Angiopoietin-2 gemeinsam behandelten Tieren erreichten statistische Signifikanz ( $p = 0,0465$ ). Parallel wurde ab dem ersten Mikroskopiezeitpunkt die Größe der Tumoren bestimmt (Abb. 16). Die Kontrollgruppe zeigte schnelleres Tumorwachstum als die Behandlungsgruppen. Am Behandlungstag 6 hatten Kontrolltiere mit durchschnittlich  $12,2 \pm 2,1 \text{ mm}^2$  Tumorgröße deutlich größere Tumore als die Tiere, die sowohl mit anti-VEGF als auch mit anti-Angiopoietin-2 behandelt wurden ( $3,9 \pm 1,5 \text{ mm}^2$ ), Tag 9:  $4,2 \text{ mm}^2$ ). Tiere der Monotherapiegruppen anti-VEGF ( $8,9 \pm 6,6 \text{ mm}^2$ ) oder anti-Angiopoietin-2 ( $7,1 \pm 3,9 \text{ mm}^2$ ) hatten ebenfalls reduzierte Tumorgößen, allerdings erreichten die Differenzen keine statistische Signifikanz. An Tag 9 wurden die Unterschiede zwischen Kontrolle und anti-VEGF/ anti-Angiopoietin-2 Behandlung größer und erreichten statistische Signifikanz ( $p = 0,0092$ ). Ab Tag 12 der Behandlung waren 4 von 5 Tieren der Kontrollgruppe verstorben und damit kein weiterer statistischer Vergleich möglich. Überlebende Tiere der Behandlungsgruppen zeigten zu späteren Zeitpunkten durchaus Tumorgößen von  $4 \times 4 \text{ mm}$ . Die Tiere verstarben trotz großer Tumoren nicht nach kurzer Zeit, anders als die Kontrollgruppen. Weiterhin zeigten die Tumore häufig große lokale Unterschiede mit avaskulären und nekrotischen Regionen zwischen vitalen Tumorregionen.



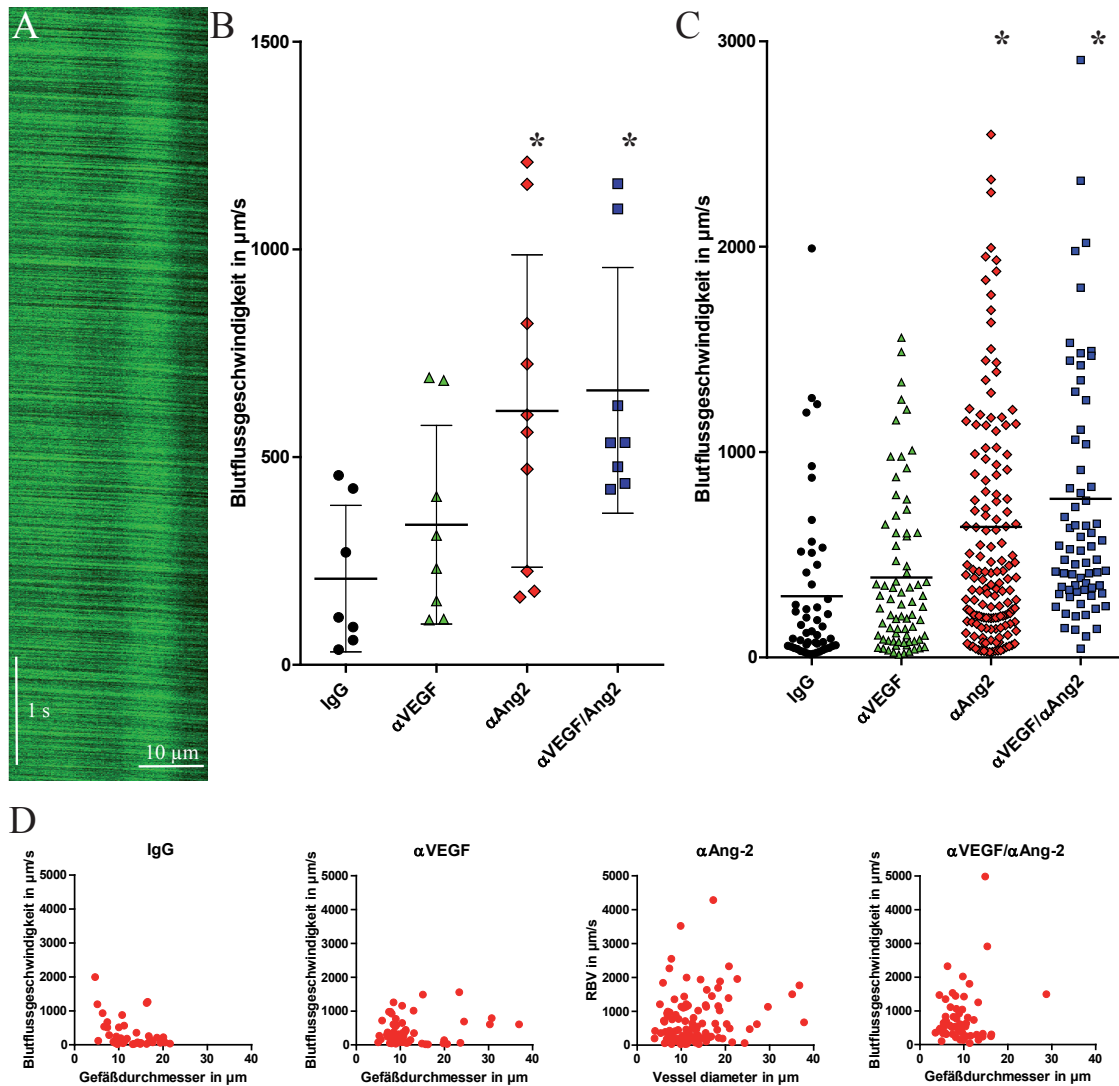


**Abbildung 16: Überleben und Tumorwachstum während antiangiogener Therapie**

Behandlungsbeginn durchschnittlich 20,3 Tage nach Tumordinjektion,  $n = 5$  Tiere pro Gruppe. A: Kaplan-Meier-Überlebensdiagramm. Tiere mit  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2-Kombinationstherapie (27 Tage) lebten signifikant ( $p = 0,0467$ ) länger als die Kontrolltiere (5 Tage). #: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. B: Verlauf der Tumorgroße ab Behandlungsbeginn. Die Tumorfäche wurde durch Messen der Tumorbreite und Tumurlänge durch das Fluoreszenzsignal bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p = 0,0092$ ) zwischen Kontrollgruppe ( $18,9 \pm 7,8$  mm<sup>2</sup>) und  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2-Gruppe ab Tag 9 (ANOVA). #: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. C: Verlauf der Tumorgroße von Tieren in Behandlungsgruppen, die länger als 14 Tage in Behandlung waren. D: Versuchsschema: Die Tumorumplantation mit PC14-PE6 Lungenkarzinomzellen fand 3-4 Wochen nach der Operation des kraniellen Fensters statt. Erreichten die Tumore einen Durchmesser von 1,5 mm wurden die Antikörper alle 3 Tage appliziert.

#### 4.2.2 Blutfluss, Gefäßdurchmesser und Gefäßvolumen

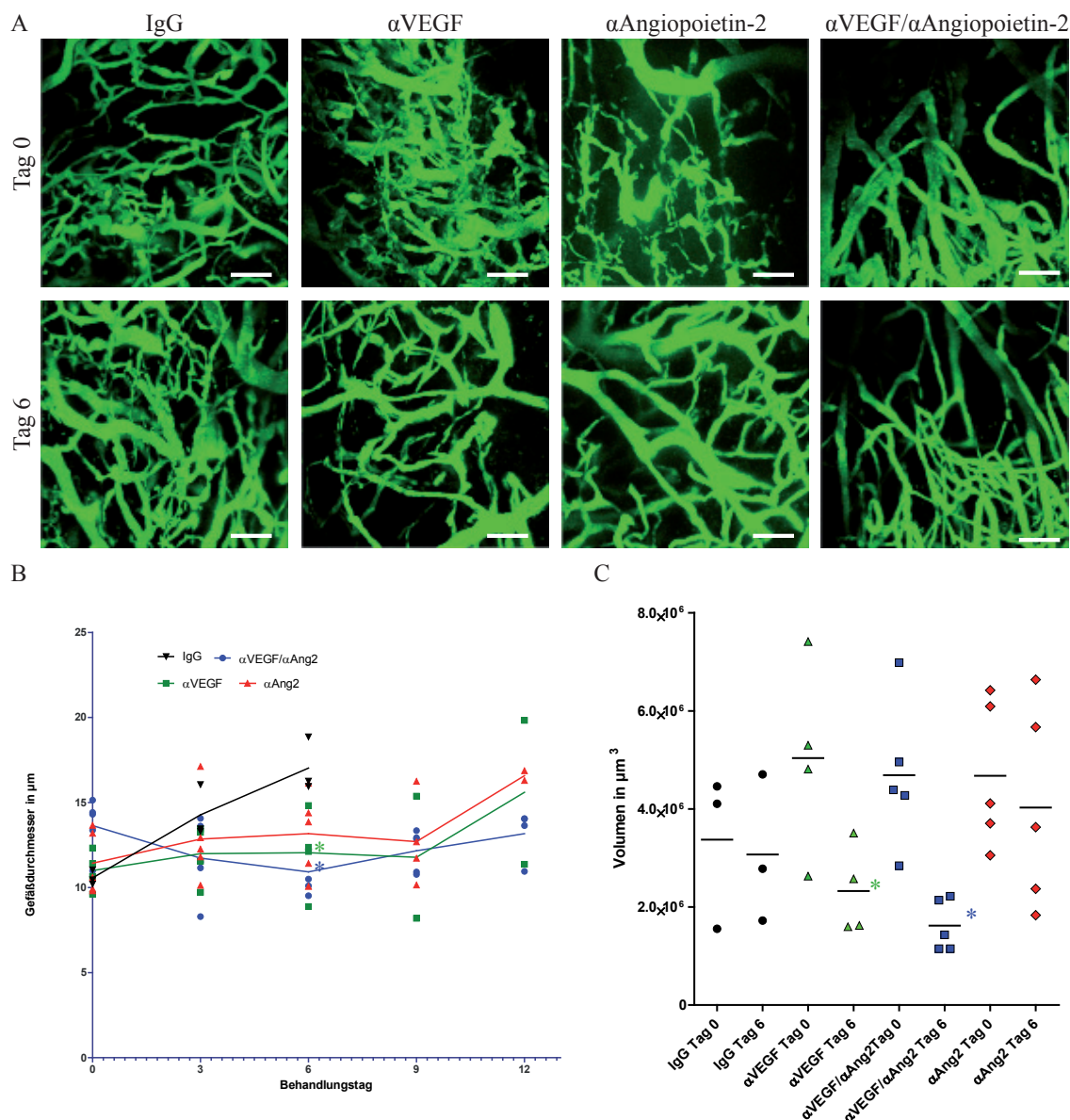
Die Blutflussgeschwindigkeit wurde sowohl in der ersten Versuchsreihe als auch in der zweiten Versuchsreihe zur Permeabilität jeweils an Tag 6 bestimmt. Aufgrund von Zeitbeschränkungen der Gesamtaufnahmedauer oder erreichten Endpunkten konnte nicht von allen Versuchstieren Daten erhoben werden. In der Kontrollgruppe wurden 51 Gefäße aus 7 Tieren, in der anti-VEGF Gruppe 74 Gefäße aus 8 Tieren, in der anti-Angiopoietin-2 Gruppe 157 Gefäße aus 10 Tieren und in der anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2 Gruppe 71 Gefäße aus 8 Tieren gemessen (Abb. 17). In der Kontrollgruppe war die große Anzahl von niedrigen Flussgeschwindigkeiten (unter 300  $\mu\text{m/s}$ ) auffällig, auch in Gefäßen mit einem Durchmesser von mehr als 10  $\mu\text{m}$ . Der Durchschnitt der Flussgeschwindigkeiten lag bei  $207 \pm 176 \mu\text{m/s}$  in der Kontrollgruppe,  $337 \pm 239 \mu\text{m/s}$  in der anti-VEGF-Gruppe,  $611 \pm 376 \mu\text{m/s}$  in der anti-Angiopoietin-2-Gruppe und  $660 \pm 295 \mu\text{m/s}$  in der anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2-Gruppe. Die Differenzen zwischen Kontrollgruppe und anti-Angiopoietin-2-Gruppe, sowie der anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2-Gruppe erreichten statistische Signifikanz ( $p = 0,0119$ ). Werte der anti-VEGF-Gruppe zeigten eine erhöhte Tendenz gegenüber den Kontrollen, die Differenzen zwischen Kontrollgruppe und anti-VEGF-Gruppe erreichten aber keine statistische Signifikanz. Unterschiede zwischen anti-Angiopoietin-2-Gruppe und anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2-Gruppe waren ebenfalls statistisch nicht signifikant. Weiterhin wurden alle drei Tage ein Angiogramm mit FITC-Dextran erstellt um Gefäßdurchmesser und Gefäßvolumen im Zeitverlauf zu verfolgen (Abb. 18). Der Gefäßdurchmesser stieg in der Kontrollgruppe von Tag 0 zu Tag 6 an, was vor allem auf die Entwicklung stark erweiterter Gefäße zurückzuführen ist. An Tag 6 sind Gefäße der Gruppen  $\alpha\text{VEGF}$  ( $11,2 \pm 2,7 \mu\text{m}$ ) und  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  ( $10,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ) im Mittel signifikant ( $0,0081$ ) schmaler als der Gruppe IgG ( $17,0 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ). In der Gruppe  $\alpha\text{Ang2}$  ( $13,2 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ) sind die Werte ebenfalls leicht reduziert. Es konnten ansonsten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden. Bei überlebenden Tieren stieg der Gefäßdurchmesser gegen Tag 12 wieder an. Dies ist vielmehr auf das Verschwinden kleiner Gefäße zurückzuführen, als auf eine Erweiterung bestehender Gefäße. Das Gefäßvolumen war an Tag 6 signifikant ( $p = 0,0029$ ) reduziert für die Gruppen  $\alpha\text{VEGF}$  (Tag 0:  $5,0 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tag 6:  $2,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ) und  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  (Tag 0:  $4,7 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tag 6:  $1,7 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ). Es wurde keine signifikante Reduktion von Tag 0 auf Tag 6 gefunden für die Kontrollgruppe (Tag 0:  $3,4 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tag 6:  $3,1 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ) und die  $\alpha\text{Ang2}$ -Behandlungsgruppe (Tag 0:  $4,7 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tag 6:  $4,0 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ). Für einzelne Regionen in den Behandlungsgruppen gelang es, diese über einen Zeitraum von 30 Tagen oder mehr zu verfolgen (Abb. 19). In der Regel verbleiben nach derart langer Behandlungszeit im Tumor nur noch Gefäße mittleren Durchmessers, die relativ gleichmäßig sind. Allerdings können nur wenige Regionen genau über die Zeit verfolgt werden, da häufig große avaskuläre Regionen auftreten, in denen keine Tumorzellen mehr vorhanden sind.



**Abbildung 17: Flussgeschwindigkeiten roter Blutkörperchen am Behandlungstag 6**

An Tag 6 der Behandlung wurden die Blutflussgeschwindigkeiten in Tumorgefäßen aller überlebenden Tiere verglichen. Tumorgefäße zeigen in der Regel eine deutliche niedrigere Blutflussgeschwindigkeit auf als gesunde Gefäße.

A: Ort-Zeit Diagramm für einen Linien-Scan eines Blutgefäßes. Jeder schwarze Streifen stammt vom Schatten eines Blutkörperchens. B: Vergleich der Flussgeschwindigkeiten für alle gemessenen Tiere an Tag 6 der Behandlung. Geschwindigkeiten der Gruppen α-Ang2 ( $611 \pm 376 \mu\text{m/s}$ ) und α-VEGF/α-Ang2 ( $661 \pm 296 \mu\text{m/s}$ ) sind signifikant höher ( $p = 0,0119$ ) als die Gruppe IgG ( $207 \pm 176 \mu\text{m/s}$ ). Die Gruppe α-VEGF ( $337 \pm 239 \mu\text{m/s}$ ) zeigt eine erhöhte Tendenz gegenüber der Kontrollgruppe, der Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz.  $N = 7, 8, 11, 10$  Tiere. \* markiert signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. C: Alle gemessenen einzelnen Blutgefäße aus B. D: Flussgeschwindigkeiten gegen Gefäßdurchmesser aufgetragen. Die Kontrolltiere zeigen auch in größeren Gefäßen (Durchmesser von  $10 \mu\text{m}$  und mehr) fast ausschließlich niedrige Flussgeschwindigkeiten. Dies tritt in den Behandlungsgruppen weniger stark auf.



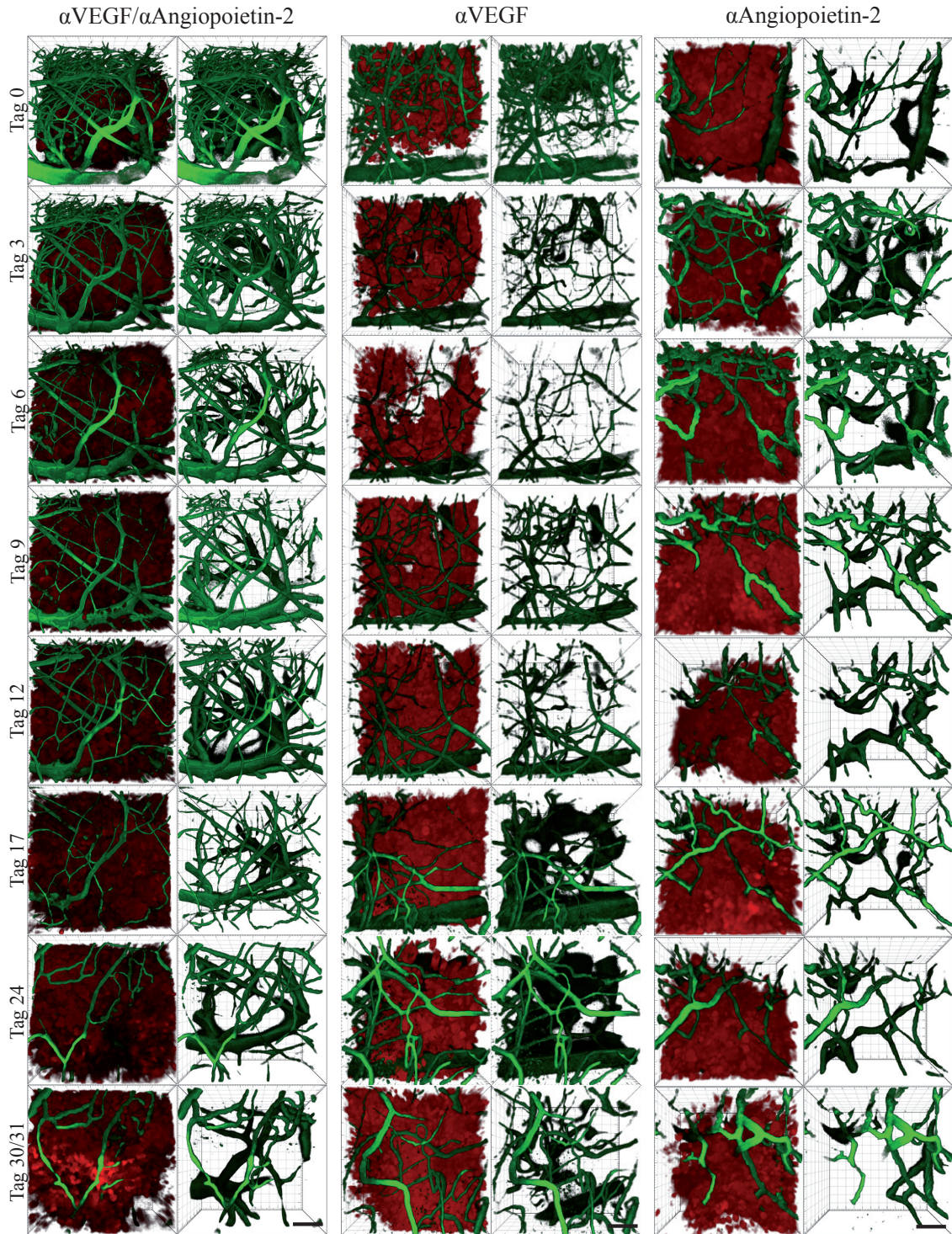
**Abbildung 18: Gefäßdurchmesser und Gefäßvolumen während antiangiogener Behandlung**

In diesem Versuch wurden die Tumorgefäße über mehrere Tage mit FITC-Dextran aufgenommen, dreidimensional rekonstruiert und die Größenveränderungen untersucht. Bei Messpunkten nach Tag 6 sind die meisten Tiere der Kontrollgruppe bereits verstorben.

A: Gefäßdarstellung der Behandlungsgruppen nach FITC-Dextran Injektion an Tag 0 und Tag 6. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ . Gezeigt sind Projektionen von 300  $\mu\text{m}$  tiefen Z-Stapeln. B: Mittelwerte der Gefäßdurchmesser in den ersten Tagen nach Behandlungsbeginn. Die Kontrolltiere zeigen in der Regel einen schnelleren Anstieg des mittleren Gefäßdurchmessers. An Tag 6 sind Gefäße der Gruppen αVEGF ( $11,2 \pm 2,7 \mu\text{m}$ ) und αVEGF/αAng2 ( $10,1 \pm 1,2 \mu\text{m}$ ) signifikant ( $p = 0,0081$ ) schmaler als der Gruppe IgG ( $17,0 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ). In der Gruppe αAng2 ( $13,2 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ) sind die Werte ebenfalls leicht reduziert.  $N = 5$  Tiere pro Gruppe. \*: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

C: Mittelwerte der Gefäßvolumen an Tag 0 und Tag 6. Gefäßvolumen ist signifikant ( $p = 0,0029$ ) reduziert für αVEGF (Tag 0:  $5,0 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tag 6:  $2,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ) und αVEGF/αAng2 (Tag 0:  $4,7 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tag 6:  $1,7 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ). \*: signifikanter Unterschied der jeweiligen Gruppe an Tag 6 verglichen mit Tag 0.





**Abbildung 19: Zeitverlauf einzelner Tumorregionen über 30 Behandlungstage**

Dargestellt sind Tumorbereiche (dsRed2 in rot, jeweils nur auf der linken Seite sichtbar) und deren Blutgefäße (durch FITC-Dextran in grün). Verlauf einer Region eines Tieres mit langer Überlebenszeit aus jeder Behandlungsgruppe, ab Beginn der Therapie an Tag 0. 3D Rekonstruktionen von 595x595x350  $\mu\text{m}$  Z-Stapeln. Teilweise verschwinden markante Blutgefäße in der Tiefe, weil der Tumor sich in Richtung des Fenster ausbreitet. Mit anhaltender Behandlung verschwinden sämtliche kleinen Gefäße in der Tumorregion, es verbleiben relativ gerade Gefäße mittleren Durchmessers. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ . Es gelingt in der Regel nur in wenigen Tieren einzelne Tumorregionen über eine derart lange Zeit zu verfolgen, deshalb ist ein statistischer Vergleich verschiedener Gruppen über 30 Tage nicht möglich.



#### 4.2.3 Blutgefäßpermeabilität für Fluorescein-Dextran (70 kDa)

Um den Einfluss der antiangiogenen Behandlung auf die Blut-Hirnschranke und die Permeabilität der Blutgefäße zu untersuchen, wurde die Gewebepenetration von Fluorescein-Dextran (70 kDa) gemessen (Abb. 20). Die molekulare Masse von 70 kDa-Dextran liegt in einer ähnlichen Größenordnung wie Serumalbumin (~66 kDa), dem Blutplasmaprotein, das wesentlich an der Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks des Blutes beteiligt ist. Bei der Injektion von Fluorescein-70 kDa-Dextran in Tieren ohne Tumor oder in kontralaterale Regionen ohne Tumorzellen konnte kein Austritt aus den Gefäßen beobachtet werden. Die zweite Versuchsreihe wurde wie zuvor in vier Gruppen durchgeführt. In  $n = 5$  Tieren pro Gruppe wurden wieder IgG-Kontrollgruppe, anti-VEGF-Gruppe, anti-Angiopoietin-2-Gruppe sowie anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2-Gruppe verglichen. Die Permeabilität wurde vor Behandlungsbeginn (Tag 0) und am Tag 6 der Behandlung bestimmt. Für die anti-Angiopoietin-2-Gruppe wurde weiterhin noch an Tag 12 der Behandlung gemessen. Da große Unterschiede sowohl zwischen den Tieren, als auch innerhalb verschiedener Regionen eines Tumors auftraten, wurden von jedem Tier vier benachbarte Regionen von jeweils  $595 \times 595 \times 100 \mu\text{m}$  Größe aufgenommen (Abb. 20). In der Kontrollgruppe erhöhte sich die mittlere Permeabilität von Tag 0 ( $6,77 \times 10^{-7} \pm 3,19 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ) auf Tag 6 ( $1,7 \times 10^{-6} \pm 7,0 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ). Beachtenswert ist ebenfalls, dass die zwei Tiere der Kontrollgruppe mit den höchsten Werten nicht bis Tag 6 überlebten. In der Gruppe der anti-VEGF behandelten Tiere verringerte sich die Permeabilität leicht von Tag 0 ( $7,5 \times 10^{-7} \pm 7,5 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ ) auf Tag 6 ( $3,3 \times 10^{-7} \pm 1,3 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ). Ähnlich verringerte sich in der Gruppe der mit anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2 behandelten Tiere die Permeabilität von Tag 0 ( $6,9 \times 10^{-7} \pm 1,9 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ) zu Tag 6 ( $5,0 \times 10^{-7} \pm 2,4 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erreichten keine statistische Signifikanz. Wird jede einzelne Region als getrennter Messwert behandelt, zeigten die anti-VEGF-Gruppe und die anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2-Gruppe statistisch signifikant geringere Permeabilität als die Kontrollgruppe an Tag 6 der Behandlung ( $p = 0,0015$ ). Die Gruppe der anti-Angiopoietin-2 behandelten Tiere zeigt einen Anstieg von Tag 0 ( $7,5 \times 10^{-7} \pm 7,5 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ ) auf Tag 6 ( $1,5 \times 10^{-6} \pm 6,8 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ ). Es gab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe an Tag 6. In diese Gruppe wurde die Therapie fortgesetzt und an Tag 12 erneut gemessen. Nun zeigte sich wieder ein Rückgang auf einen niedrigeren Wert von  $7,3 \times 10^{-7} \pm 2,7 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$ . Allerdings kann dieser Wert nicht mehr mit Kontrollgruppen verglichen werden, da unbehandelte Tiere nicht bis zu diesem Zeitpunkt überlebten. Deshalb können Faktoren wie lokale Avaskularität und eine generelle Verschlechterung der Bildqualität diesen Messwert beeinflussen.



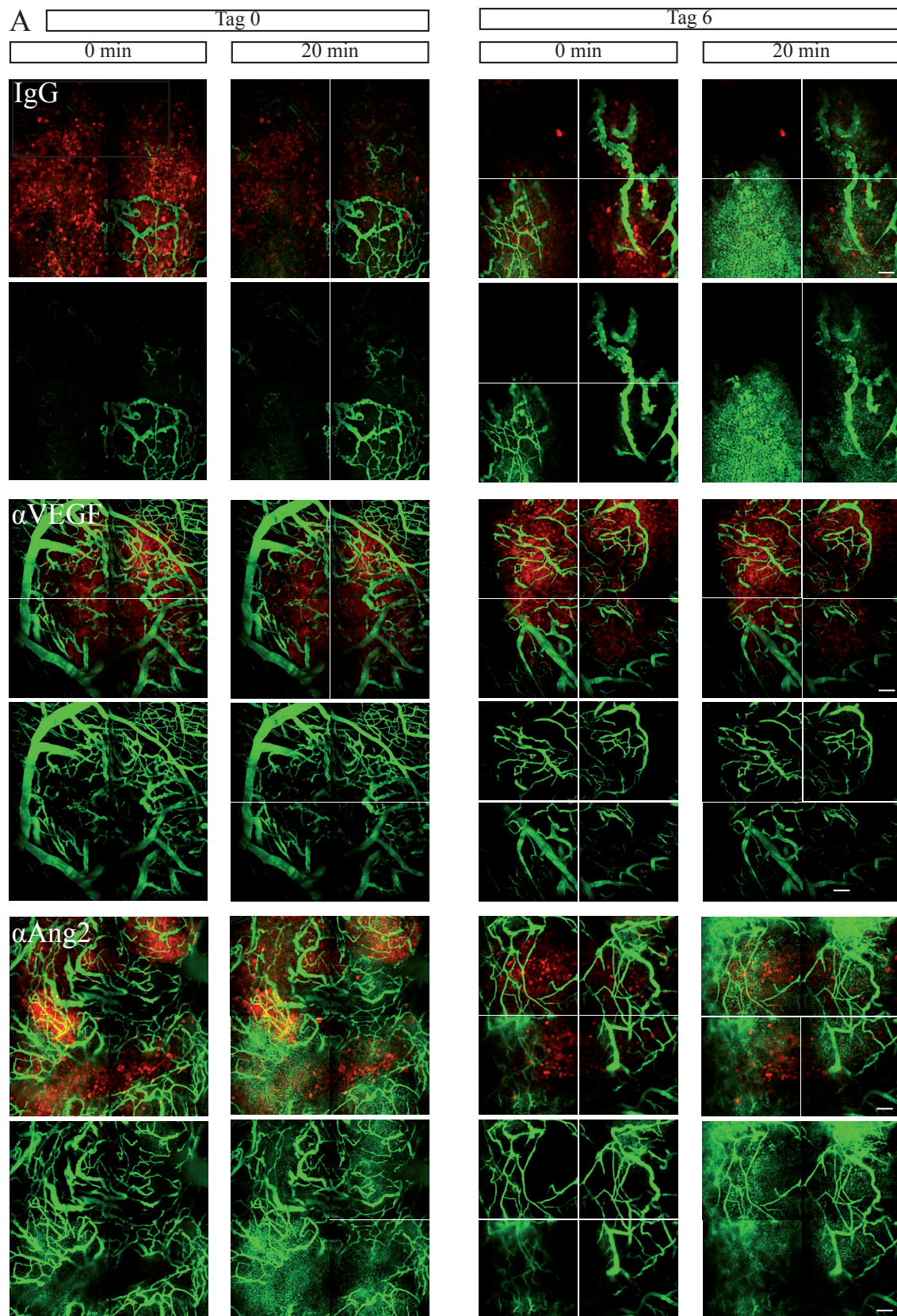
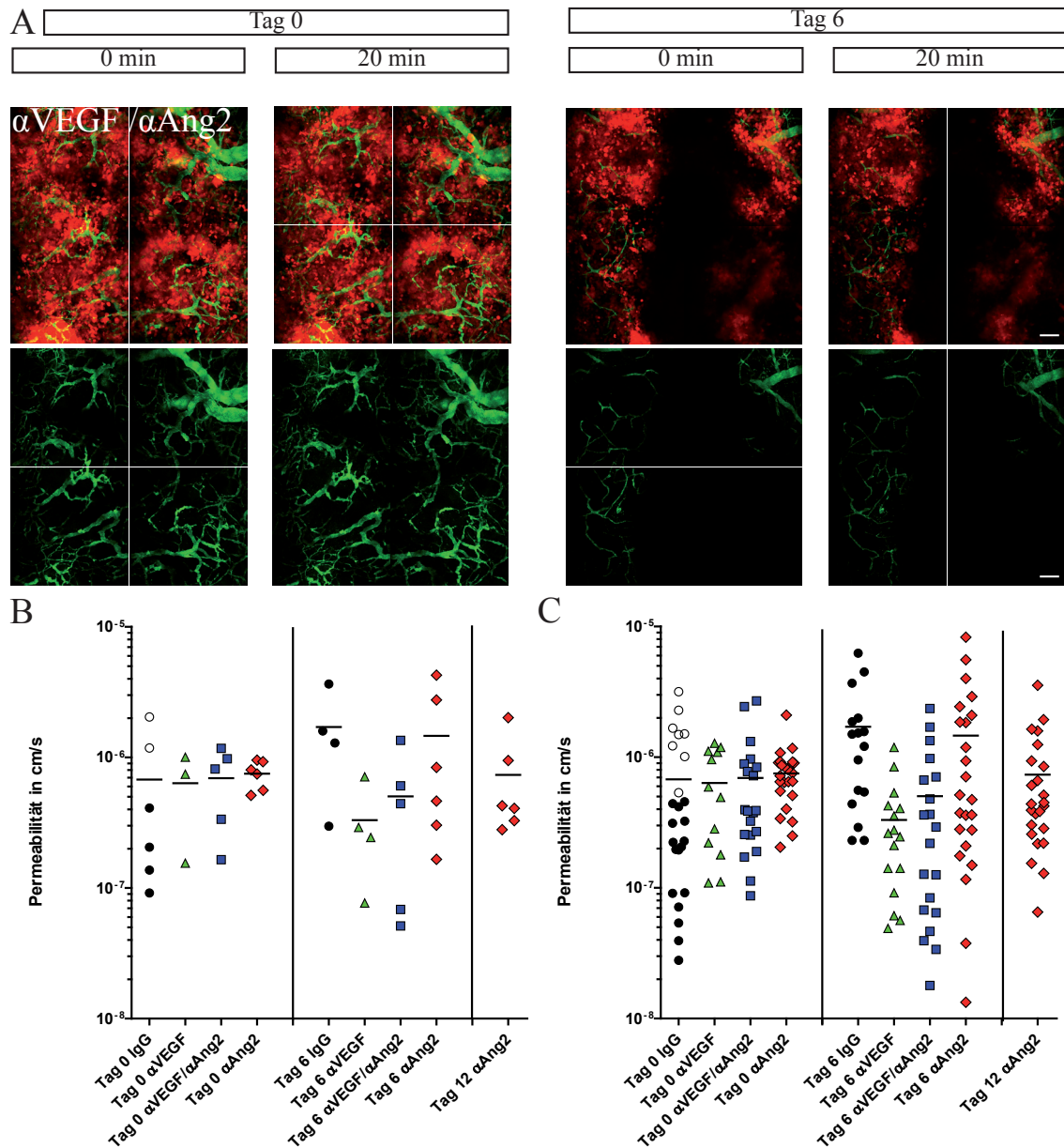


Abbildung 20: Permeabilität für 70 kDa-Dextran-Fluorescein (Legende rechts)



**Abbildung 20: Permeabilität für 70 kDa-Dextran-Fluorescein**

In diesem Versuch wurde den Versuchstieren 70 kDa-Dextran-Fluorescein (grün) i.v. zum Zeitpunkt 0 injiziert und der Austritt des Farbstoffs im Tumor (rot) über 20 min. verfolgt. Der Versuch wurde für jedes Tier einmal vor der Antikörper-Behandlung und erneut am Tag 6 der Therapie durchgeführt.

**A:** Penetration von 70 kDa-Dextran (grün) für jeweils ein Tier aus den Gruppen IgG,  $\alpha$ VEGF,  $\alpha$ Ang2 und  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2. Es sind jeweils 4 benachbarte Regionen eines Tieres vor der Therapie (Tag 0) und an Tag 6 der Behandlung (Tag 6) zu einem Bild zusammengefügt, zu Beginn der Injektion (0 min) und 20 Minuten später. Die oberen Regionen zeigen Tumor (rot) und FITC-Dextran (grün), die unteren vier die gleiche Aufnahme nur im grünen Kanal. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

In Tieren der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Antikörper gegen Ang2 erhielt war an Tag 6 20 min. nach Applikation des Farbstoffes ein starker Austritt des Farbstoffs aus den Gefäßen zu beobachten. Tiere die Antikörper gegen VEGF erhielten, zeigten weitaus weniger Austritt des Farbstoffs.

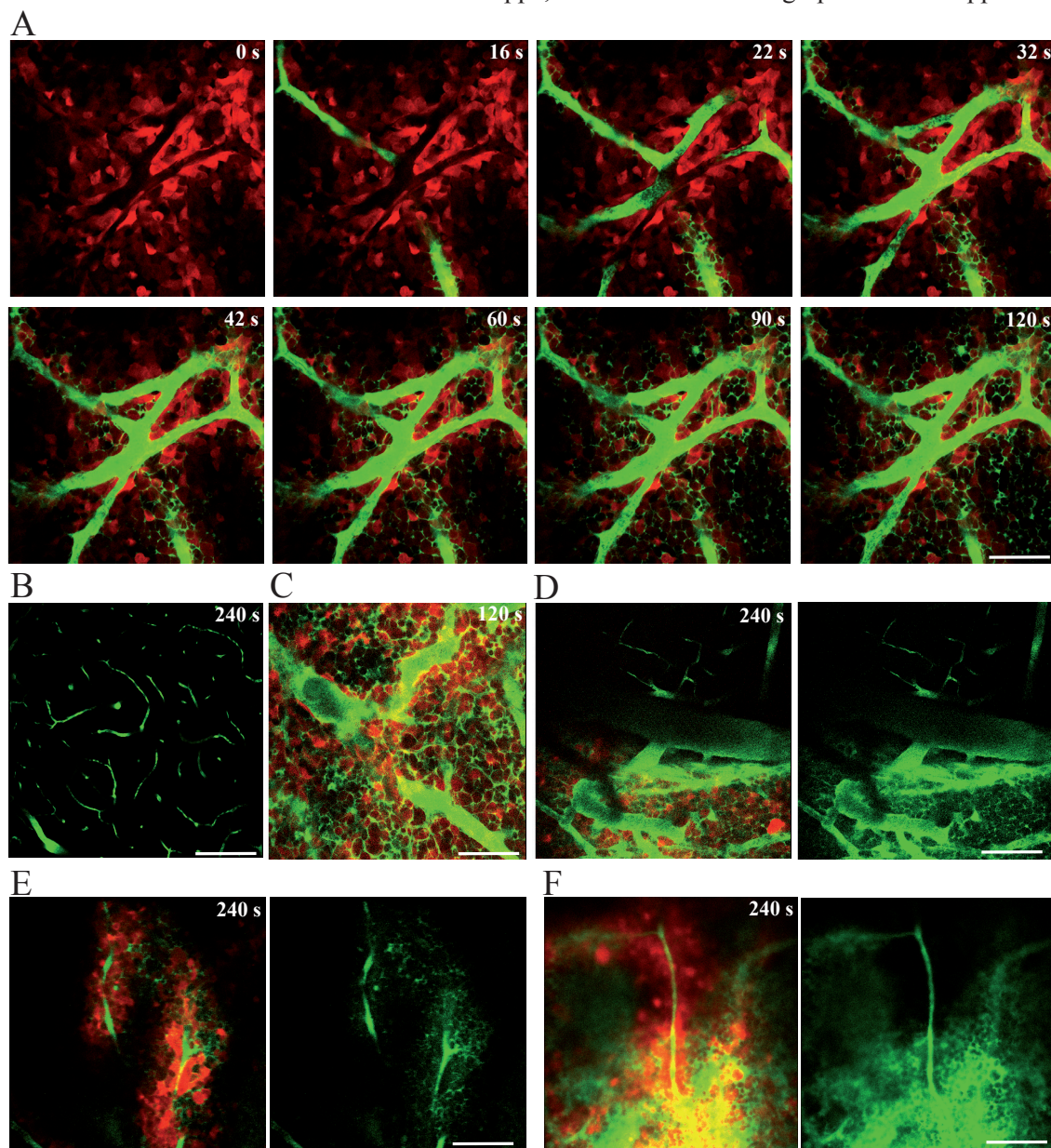
**B:** Permeabilität für die Behandlungsgruppen an Tag 0 und Tag 6. Mittelwerte für jedes Tier sind dargestellt,  $n = 4-6$  Tiere pro Gruppe. Tiere der Kontrollgruppe mit hohen Werten an Tag 0 (leere Kreise) sind bereits vor Tag 6 verstorben. Es ist ein Anstieg in der Kontrollgruppe von Tag 0 ( $6,77 \times 10^{-7} \pm 3,19 \times 10^{-7}$  cm/s) auf Tag 6 ( $1,7 \times 10^{-6} \pm 7,0 \times 10^{-7}$  cm/s), ein Anstieg in der  $\alpha$ Ang2-Gruppe von Tag 0 ( $7,5 \times 10^{-7} \pm 7,5 \times 10^{-8}$  cm/s) auf Tag 6 ( $1,5 \times 10^{-6} \pm 6,8 \times 10^{-7}$  cm/s), aber ein leichter Rückgang in der Gruppe  $\alpha$ VEGF von Tag 0 ( $6,3 \times 10^{-7} \pm 2,5 \times 10^{-7}$  cm/s) zu Tag 6 ( $3,3 \times 10^{-7} \pm 1,3 \times 10^{-7}$  cm/s) und in der Gruppe  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2 an Tag 0 ( $6,9 \times 10^{-7} \pm 1,9 \times 10^{-7}$  cm/s) zu Tag 6 ( $5,0 \times 10^{-7} \pm 2,4 \times 10^{-7}$  cm/s) zu sehen. Zusätzlich wurde für die  $\alpha$ Ang2-Gruppe noch ein weiterer Zeitpunkt an Tag 12 gemessen ( $7,3 \times 10^{-7} \pm 2,7 \times 10^{-7}$  cm/s). Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz.

**C:** Alle 4 Messregionen jedes Tieres dargestellt. Leere Kreise in der Kontrollgruppe stammen von vor Tag 6 verstorbenen Tieren.



#### 4.2.4 Penetration von Natrium-Fluorescein und fluoreszenzmarkierten Antikörpern

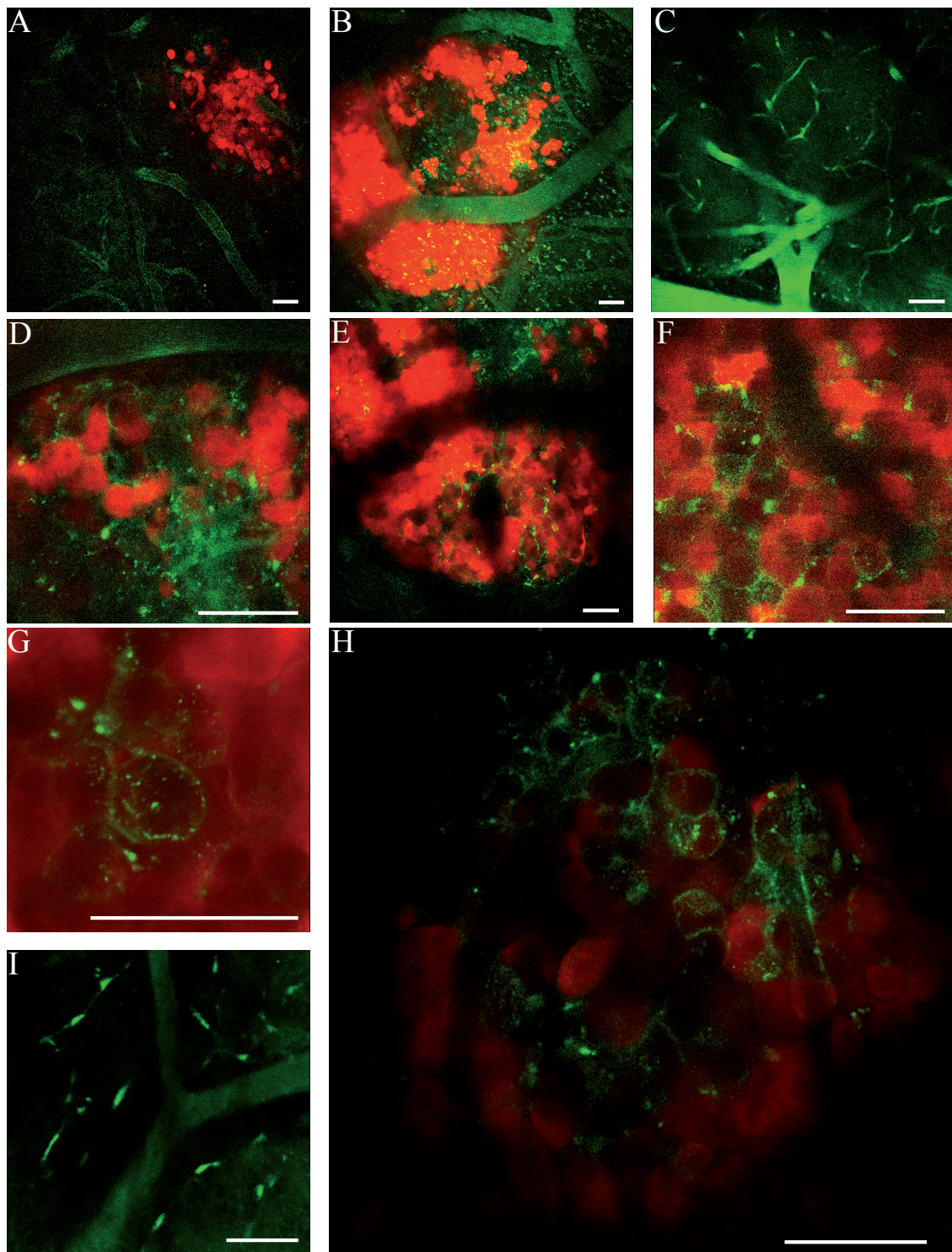
Weiterhin wurde die Permeabilität von niedermolekularem Natrium-Fluorescein (332 Da) in einzelnen Tieren untersucht (Abb. 21). Eine intakte Blut-Hirn-Schranke verhindert im gesunden Gehirn den Austritt von Natrium-Fluorescein. In einem unbehandeltem Tier mit Tumor dagegen trat an Tag 6 innerhalb von 60-90 Sekunden genug Farbstoff aus, um den gesamten Tumorbereich zu füllen. Auch in den untersuchten behandelten Tieren wurde an Tag 6 und Tag 12 ein starker Austritt des Farbstoffes innerhalb von 120 Sekunden nach Injektion des Farbstoffes beobachtet. Dies konnte für ein Tier der anti-VEGF-Gruppe, ein Tier der anti-Angiopoietin-2 Gruppe und



**Abbildung 21: Eigenschaften der Penetration von Natrium-Fluorescein (332 Da) im Tumor**

A: Zeitserie in den ersten Sekunden nach Injektion (bei  $t = 0$ ) des Farbstoffes am Behandlungstag 6 gegen VEGF. Innerhalb von 120 Sekunden ist das gesamte Tumoreareal geflutet. Die antiangiogene Behandlung hat somit kaum Einfluss auf die Penetration dieses niedermolekularen Stoffes. B: Kontralaterale Stelle des gesunden Gehirns ohne Tumor. Die Blut-Hirn-Schranke verhindert jeglichen Austritt weitgehend. C: Unbehandeltes Tier an Tag 6. Starker Austritt erkennbar. D: Tumorgrenze eines unbehandelten Tieres, Austritt ist auf den Tumorbereich beschränkt und tritt auch nach einigen Minuten nicht ins gesunde Gehirn über. E: Tier an Behandlungstag 9 mit  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2. Tumorzellen sind lokal an Blutgefäßen beschränkt. Farbstoff nur im Tumorzellbereich aus. F: Tier an Behandlungstag 12 mit  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2, ein Gefäß zeigt nur geringen Austritt. Dieser Effekt trat nur selten auf. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.





**Abbildung 22: Verteilung eines Alexa 488-anti-c-Met-Antikörpers in vivo**

In diesem Versuch wurde überprüft, ob es generell möglich ist fluoreszenzmarkierte Antikörper in vivo zu verfolgen. Dargestellt sind Aufnahmen im Tumorbereich (rot) nach einmaliger Injektion eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers (grün). Zunächst ist ein unspezifischer Austritt zu sehen, vor allem oberflächlich und im Tumor. Nach einigen Tagen verbleibt der Antikörper nur noch an Tumorzellen und oberflächlichen Blutgefäßen.

A: Unspezifischer Austritt 10 min nach i.v. Injektion. B: 1 h nach i.p. Injektion. C: 1 h nach i.p. Injektion contralateral ohne Tumor, Gefäße zeigen eine höhere Fluoreszenz als das umgebende Gewebe. D: Nach 20 h verbleibt mehr Signal im Bereich des Tumors. E: Nach 4 Tagen verbleiben einige Tumorzellen markiert. F: Markierung an Tumorzellen nach 8 Tagen. G: Nahaufnahme der Lokalisation nach 12 Tagen, eine einzelne Zelle zeigt verstärkte Markierung der Membran und einzelne helle Foci. H: Lokalisation nach 12 Tagen, einige Zellen des Tumors sind stark markiert, andere überhaupt nicht. I: Fluoreszenz an Kapillaren an der Oberfläche nach 12 Tagen. Maßstabsbalken: 50 µm

Eine Lokalisierung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Tumoren des Gehirns in vivo ist somit nach einigen Tagen möglich, eine Quantifizierung des Austritts erscheint jedoch nicht sinnvoll.

zwei Tieren der anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2-Gruppe beobachtet werden. Weiterhin war der Austritt sehr begrenzt auf die Region des Tumors beschränkt und trat in den ersten 10 Minuten nach Injektion nicht ins gesunde Gehirn über. In Tieren die 9 Tage oder länger mit anti-VEGF/anti-Angiopoietin-2 Antikörpern behandelt wurden, sind gelegentlich Stellen zu finden, an denen Tumorzellen nur noch in der Nähe von Blutgefäßen zu sehen sind. Selten sind einzelne Gefäße zu sehen, die eine geringe Permeabilität aufzeigen.

Ein Alexa488-markierter Antikörper gegen c-Met wurde sowohl intravenös als auch intraperitoneal injiziert, jeweils 125 µg (Abb. 22). Dies entspricht etwa einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht, wie sie auch in den therapeutischen Versuchen verwendet wurde. In beiden Fällen ist nach einer Stunde eine deutlich sichtbare Fluoreszenz in den Blutgefäßen zu beobachten. Oberflächlich tritt sehr viel Farbstoff aus, der auch 24 Stunden und 4 Tage später noch zu sehen ist. Nach 8 Tagen ist das meiste unspezifische Signal verschwunden. Einige, aber nicht alle Tumorzellen bleiben jedoch markiert. Nach 12 Tagen konnten auch einzelne markierte Stellen an oberflächlichen Kapillaren gefunden werden. Aufgrund der geringen Helligkeit im Gewebe wurden keine Permeabilitätsmessungen bei einer größeren Zahl von Tieren durchgeführt.

#### **4.2.5 Antiangiogene Behandlung in Kombination mit Chemotherapie (Irinotecan und Etoposid)**

Aufgrund der mäßigen Therapieerfolge von Bevacizumab als Monotherapie von Krebserkrankungen ist die Kombination einer antiangiogener Behandlung mit der Chemotherapie von besonderem Interesse.

Für diese Arbeit wurde deshalb vom Kooperationspartner Roche die verwendete Zelllinie PC14-PE6 in Zellkultur auf Sensitivität gegenüber üblich verwendeten klinischen Zytostatika getestet. Vincristin (ab 1 µM), Etoposid (ab 3 µM) und Irinotecan (Verlangsamung des Zellzyklus ab 1 µM, Arrest ab 10 µM) zeigten eine inhibitorische Wirkung auf den Zellzyklus, in der Regel einen Arrest in der G2-Phase vor der Mitose und eine erhöhte Zahl an toten Zellen. Carboplatin, Carmustin, Temozolomid und Procarbazin zeigten erst in hoher Konzentration wirksame Effekte oder gar nicht. Zunächst wurden Irinotecan und Etoposid einmalig jeweils als Monotherapie in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht an Tag 14 nach Tumorzellinjektion verabreicht. In diesen Vorversuchen konnte keine Verlängerung der Überlebenszeit bei jeweils zwei Tieren mit Tumoren beobachtet werden. Deshalb wurde für die Versuchsgruppen eine höhere Dosis von jeweils 50 mg/kg Körpergewicht Etoposid und Irinotecan gleichzeitig gewählt. Zwei gesunde Tiere zeigten bis einer Woche nach der Injektion bei dieser Dosis keine Auffälligkeiten.

Es wurden vier Versuchsgruppen untersucht, erstens eine Kontrollgruppe, zweitens nur antiangiogene Behandlung (mit  $\alpha$ -VEGF und  $\alpha$ -Angiopoietin-2 zusammen), drittens nur Chemotherapie mit Irinotecan und Etoposid und viertens sowohl antiangiogene Behandlung und Chemotherapie gemeinsam.

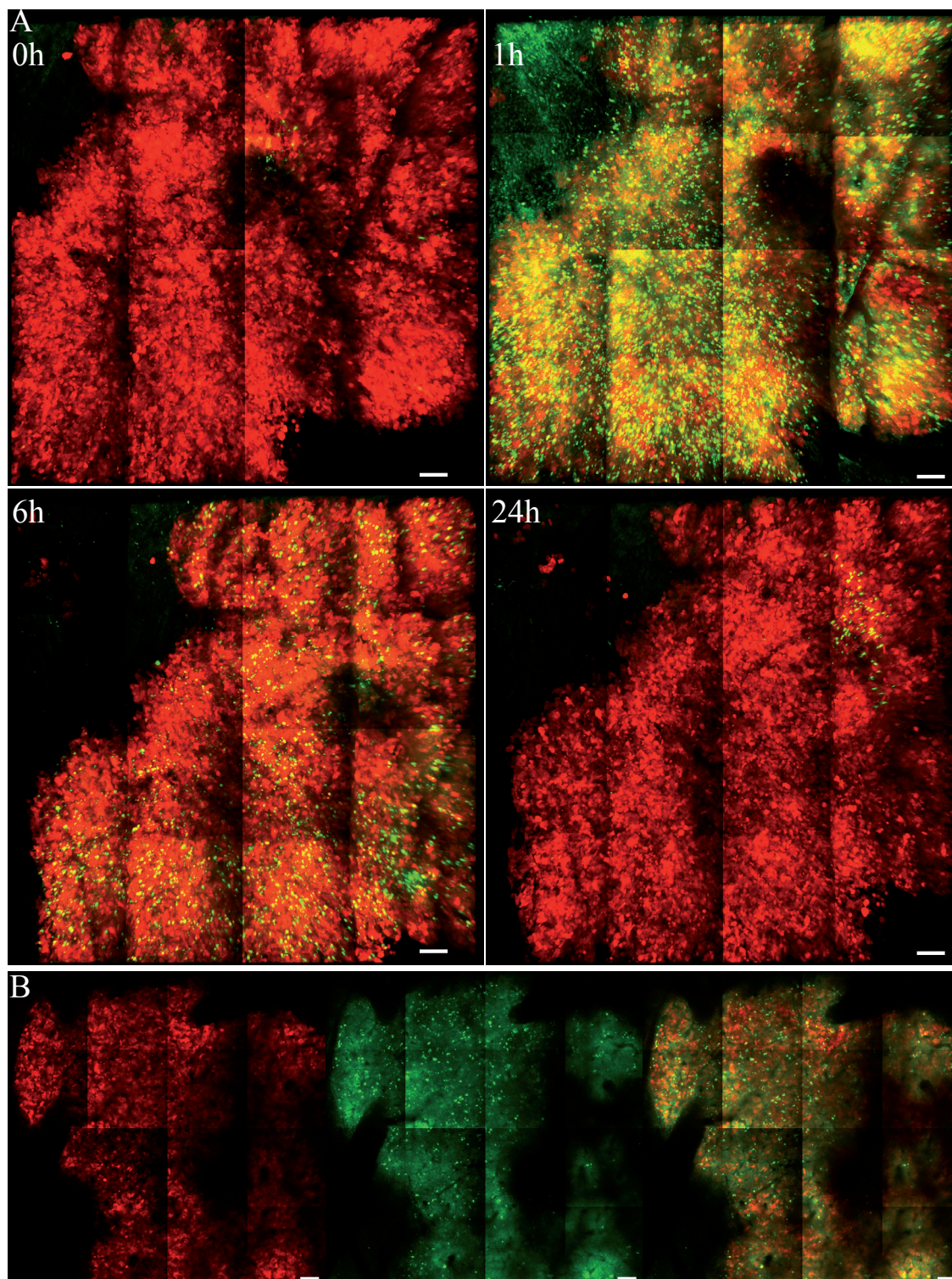
Zusätzlich wurde zur Quantifizierung von apoptotischen Zellen vor jedem Mikroskopiezeitpunkt Acridinorange appliziert und die Dichte an positiven Zellen im Tumor bestimmt. Acridinorange zeigt eine Stunde nach intraperitonealer Injektion eine starke Anreicherung im Tumor und

markiert einzelne Zellen (Abb. 23.) Nach 6 Stunden ist der Hintergrund im Tumor stark reduziert, es sind weniger Kerne markiert. Nach 24 Stunden ist kein Signal mehr messbar.

Die Gruppengrößen umfassten 5-7 Tiere. Beim Verlauf der Acridinorangemarkierung (Abb. 24) konnte in der Kontrollgruppe IgG + DMSO über den Zeitverlauf ein Abfall der Dichte an markierten Kernen beobachtet werden. In der Gruppe IgG + Irinotecan/Etoposide zeigte sich am Tag 17 ( $89 \pm 17$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ) und Tag 20 ( $78 \pm 14$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ) (entspricht 24 h, bzw. 4 Tage nach Applikation der Chemotherapie) eine Tendenz einer Erhöhung der Markierungen gegenüber den Gruppen  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/Etoposide (Tag 17:  $56 \pm 30$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ; Tag 20:  $58 \pm 27$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ), IgG + DMSO (Tag 17:  $67 \pm 14$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ; Tag 20:  $64 \pm 20$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ) und  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + DMSO (Tag 17:  $60 \pm 19$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ; Tag 20:  $50 \pm 21$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ). Aufgrund der hohen Varianz zwischen den Tieren erreichten die Unterschiede weder an Tag 17 ( $p = 0,11$ ) noch an Tag 20 ( $p = 0,28$ ) statistische Signifikanz. Von Tag 23 ( $59 \pm 32$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ) bis Tag 29 ( $79 \pm 24$  Kerne pro  $\text{mm}^2$ ) ist in der Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + DMSO ein erneuter Anstieg der Dichte zu sehen.

Beim Vergleich der Überlebensdauern (Abb. 25) zeigte die Gruppe mit  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + DMSO ebenso wie zuvor eine signifikante Verlängerung der medianen Überlebensdauer (43 Tage) im Vergleich mit der Gruppe IgG + DMSO (24 Tage), aber auch gegenüber der Gruppe IgG + Irinotecan/Etoposide (33 Tage,  $p = 0,0018$ ) und  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/Etoposide (26 Tage). Tiere der Gruppe IgG + Irinotecan/Etoposide lebten auch statistisch signifikant länger als die Gruppen  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/Etoposide ( $p = 0,0309$ ) und IgG + DMSO ( $p = 0,0084$ ). Beim Vergleich der Tumorgrößen (Abb. 25) zeigten Tiere der Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/ Etoposide an Tag 20 (Behandlungstag 6) signifikant kleinere Tumore als die Gruppe IgG + DMSO ( $2,7 \pm 1,1 \text{ mm}^2$  gegenüber  $6,9 \pm 2,2 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,011$ ). Am Tag 23 (Behandlungstag 9) zeigten die Tiere der Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/Etoposide und die Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + DMSO signifikant kleinere Tumore als die Gruppe IgG + DMSO ( $3,1 \pm 1,0 \text{ mm}^2$  gegen  $4,6 \pm 1,7 \text{ mm}^2$  gegen  $10,8 \pm 3,3 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,0028$ ). Zu weiteren Zeitpunkten wurden keine weiteren signifikanten Unterschiede gemessen.

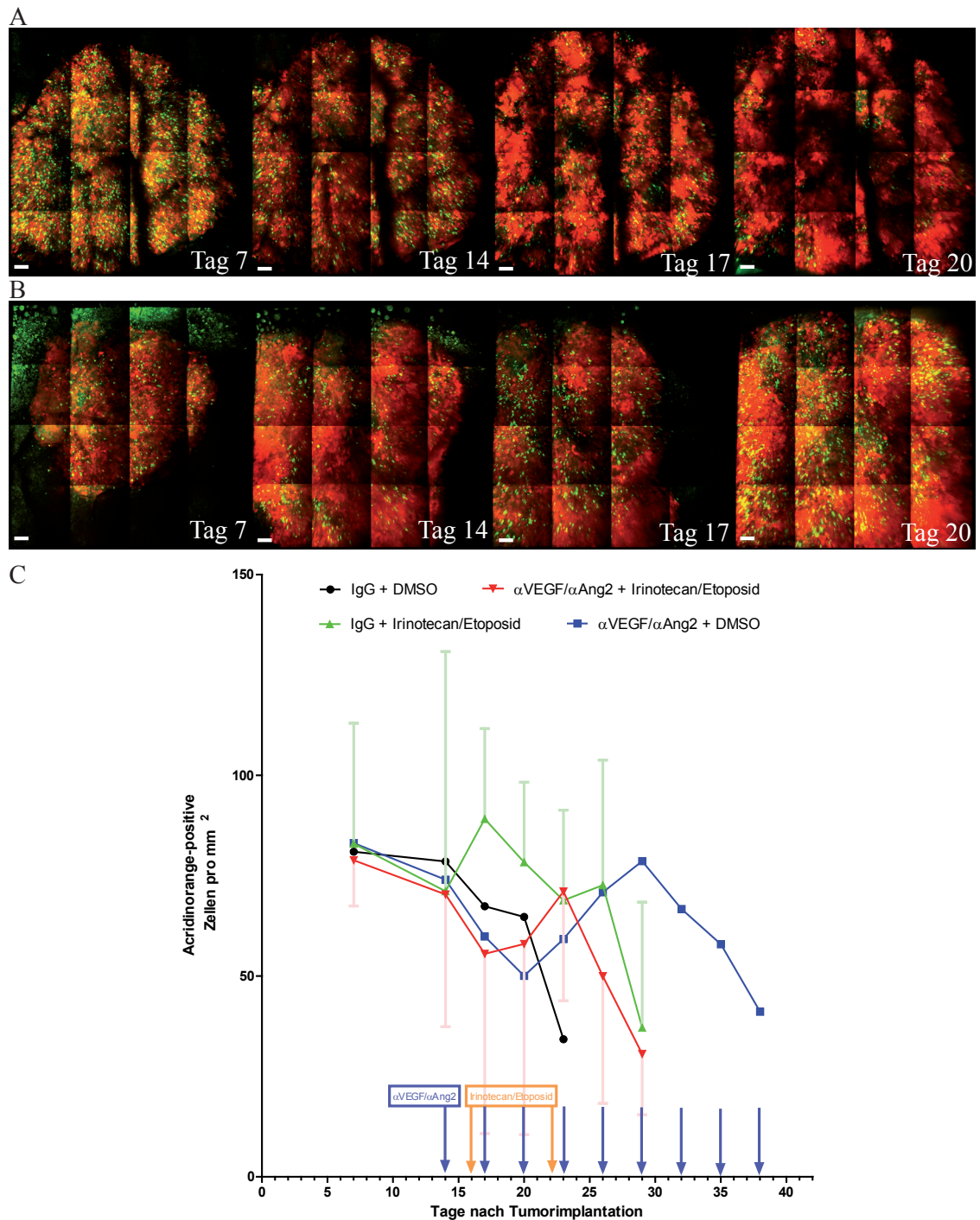




**Abbildung 23: Zeitverlauf einer Acridinorange Injektion zur Zelltotbestimmung über 24 h**

A: Intraperitoneale Injektion von 3 mg/kg Körpergewicht Acridinorange (grün) an Tag 7 nach Tumorzellinjektion (dsRed2, rot). Dargestellt ist eine dreidimensionale Ansicht einer 1,7 mm großen Tumorregion, die im Abstand weniger Stunden wiederholt aufgenommen wurde. Vor der Injektion sind nur wenige grüne autofluoreszente Stellen sichtbar. Eine Stunde nach der Injektion ist eine deutliche Penetration von Acridinorange im Tumor anhand der erhöhten Grünfluoreszenz im Hintergrund zu erkennen. Die Kerne vieler Tumorzellen sind deutlich markiert. Nach 6 h ist der Acridinorange-Hintergrund im Tumor deutlich reduziert, es sind weniger Zellen als zuvor markiert. Nach einem Tag ist kein Acridinorangesignal mehr messbar, bei den verbleibenden Stellen handelt es sich wahrscheinlich wieder um Autofluoreszenz. B: Einzelne Schnittebenen des roten, grünen und beider Kanäle. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

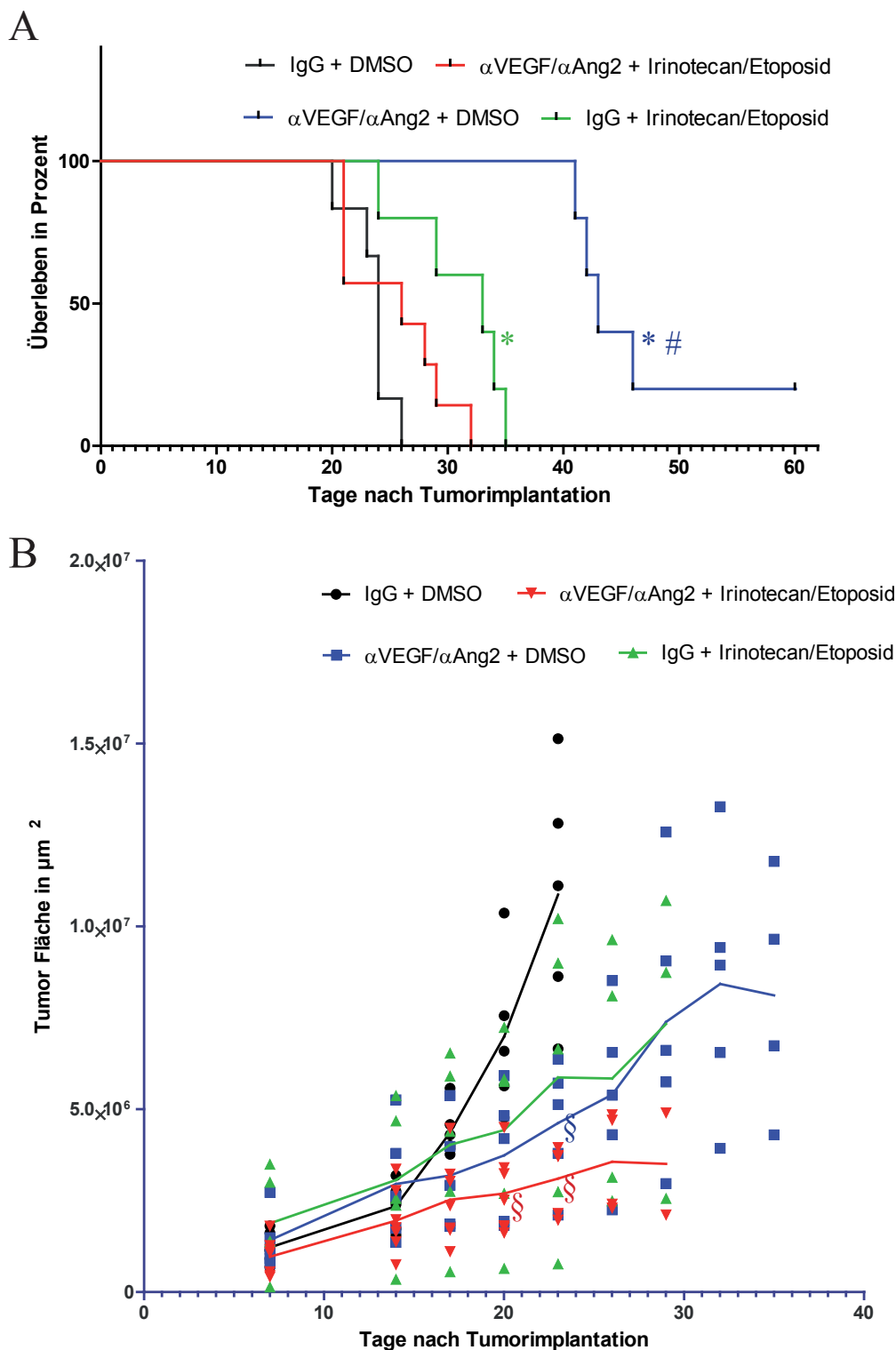




**Abbildung 24: Verlauf der Acridinorangegefärbung zur Zelltodbestimmung während einer Chemotherapie**

A und B sind dreidimensionale Aufnahmen jeweils eines Tumorbereichs (dsRed2, rot), der über zwei Wochen verfolgt wurde. 1h vor jeder Aufnahme wurde Acridineorange (grün) i.p. appliziert.

A: Tier aus der Behandlungsgruppe  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2 + Irinotecan/Etoposid, zeigt repräsentativ einen Rückgang an Acridinorange-positiven Zellen im Verlauf des Tumorwachstums. B: Tier aus der Behandlungsgruppe IgG + Irinotecan/Etoposid. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m. In diesem Tier ist nach der Applikation der Chemotherapie (Tag 16) ein Anstieg der markierten Zellen sichtbar. C: Verlauf der Anzahl Acridinorange-positiver Zellkerne pro mm<sup>2</sup> Tumorfläche während der Behandlung. Aus Gründen der Übersicht ist die Standardabweichung nur für die beiden Gruppen mit Chemotherapie eingetragen. N = 5-7 Tiere pro Gruppe, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an Tag 17 (p = 0,11) oder Tag 20 (p = 0,28). Während Kontrollen und Tiere, die antiangiogene Behandlung erhielten einen Abfall der Dicht an Acridinorange-positiven Zellen zeigen, ist in der Gruppe der Chemotherapie ein leichter Anstieg in den Tagen nach der Applikation zu erkennen. Ein späterer Anstieg der positiven Zellen in der Gruppe der antiangiogenen Behandlung könnte vom gefäßabhängigen Tumorzellrückgang erzeugt worden sein.



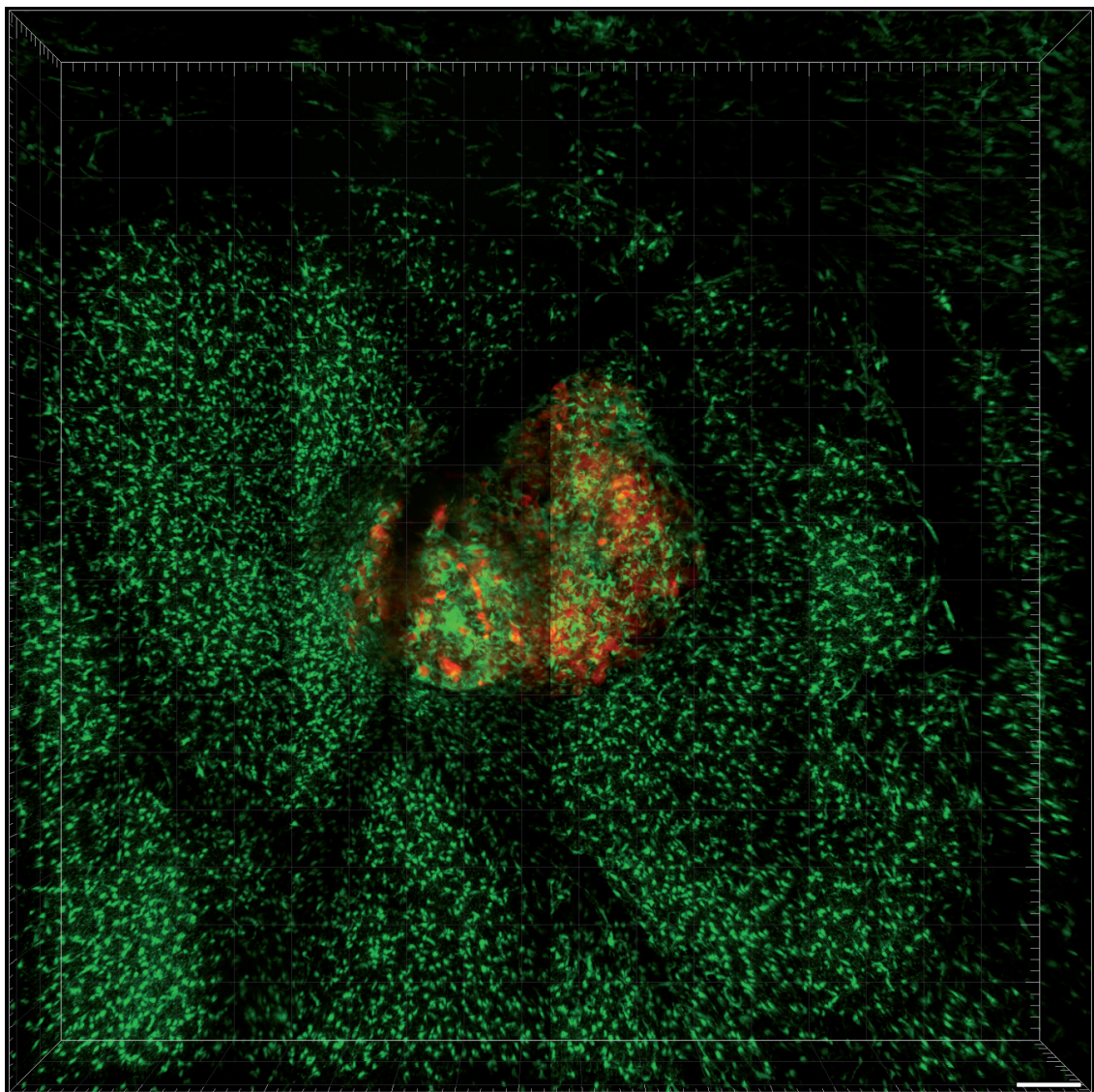
**Abbildung 25: Überleben und Tumorwachstum bei Chemotherapie**

A: Kaplan-Meier Überlebenskurve. N = 5-7 Tiere. Tiere der  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + DMSO Gruppe (43 Tage) überlebten signifikant länger als Tiere der Gruppe Chemotherapie (33 Tage,  $p = 0,0018$ ). Tiere der Gruppe der Chemotherapie lebten signifikant länger als Tiere der Gruppe der Kontrolltiere (24 Tage,  $p = 0,0084$ ) und der Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/Etoposid (26 Tage,  $p = 0,0309$ ). \*: signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe, #: signifikanter Unterschied zur Chemotherapiegruppe. B: Tumorgröße als Fläche in  $\mu\text{m}^2$ . In der Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + Irinotecan/Etoposid ist die Tumorgröße an Tag 20 ( $2,7 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,011$ ) und Tag 23 ( $3,1 \text{ mm}^2$ ,  $p = 0,0028$ ) signifikant kleiner als die der Kontrolltiere ( $6,9 \text{ mm}^2$  bzw.  $10,8 \text{ mm}^2$ ). In der Gruppe  $\alpha\text{VEGF}/\alpha\text{Ang2}$  + DMSO ist die Tumorgröße ( $4,6 \text{ mm}^2$ ) nur an Tag 23 signifikant kleiner als die Kontrollgruppe. Keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. N = 5-7 Tiere pro Gruppe. §: signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe

#### 4.2.6 Intravitalmikroskopie von Mikroglia und Makrophagen während des Wachstums von Gehirnmastasen und antiangiogener Behandlung

Zur Untersuchung der Rolle von Mikroglia und Makrophagen bei der antiangiogenen Behandlung von Gehirnmastasen wurden doppelt transgene  $Cx_3cr1^{GFP} \times Foxn1^{nu}$  Mäuse gezüchtet. Die Tiere haben GFP-positive Mikroglia und Makrophagen und eignen sich aufgrund der Immundefizienz zur Verwendung von Xenotransplantationen humaner Tumorzelllinien.

Injektionen von PC14-PE6-dsRed2 Lungenkarzinomzellen ins Gehirn führten ebenso wie in gewöhnlichen Nacktmäusen zum Wachstum von Tumoren. Mikroglia in der nahen Umgebung eines Tumors erscheinen normal in Größe, Form und Abtastverhalten der Feinprozesse. Erst bei unmittelbarem Kontakt zum Rand des Tumors ändert sich das Erscheinungsbild zu einer



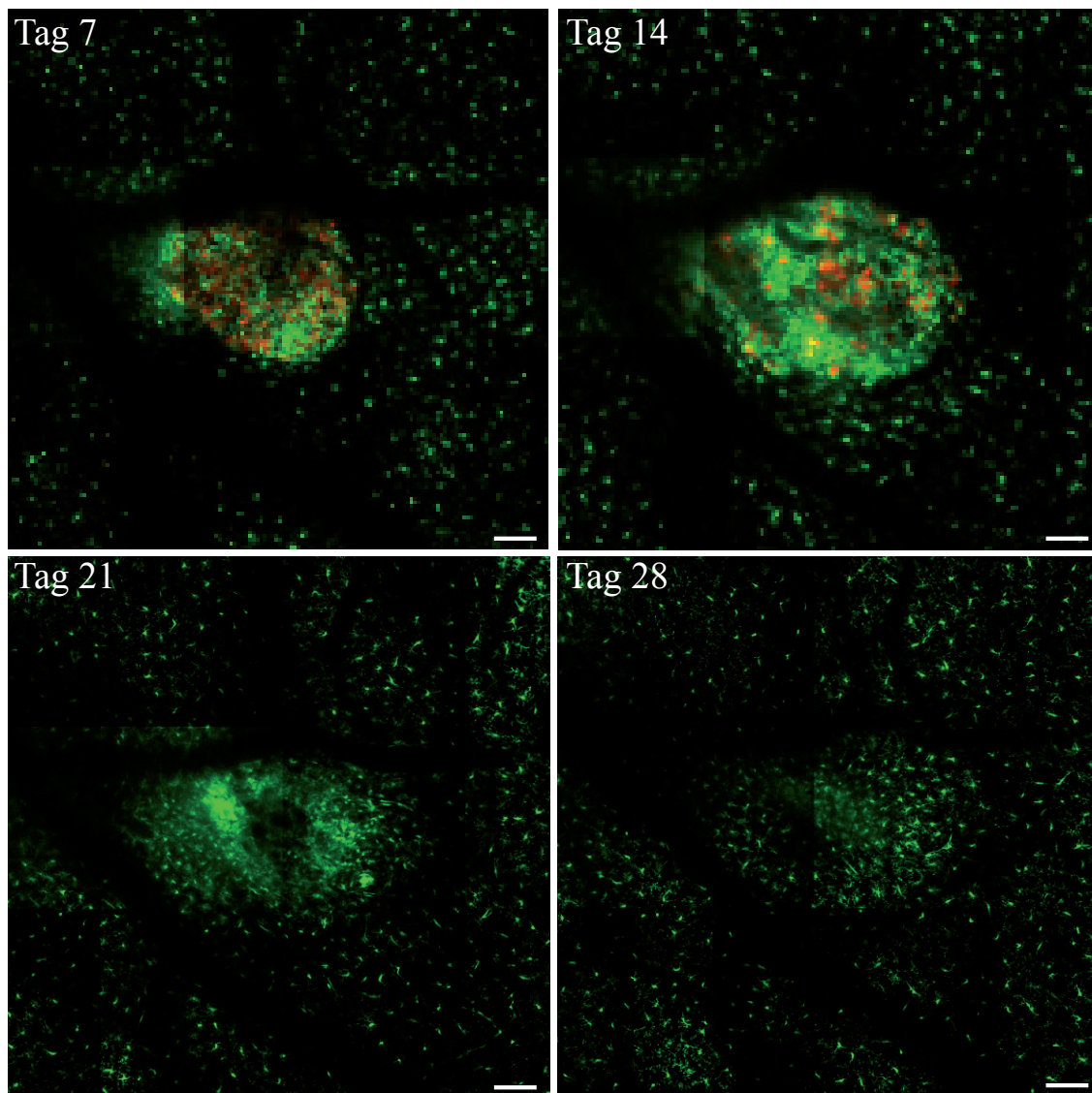
**Abbildung 26: PC14-PE6 Tumor im Gehirn einer  $Cx_3cr1^{GFP/+} \times Foxn1^{nu/nu}$  Maus**

4x4 Tile-Scan Rekonstruktion eines 1700x1700x300 µm Stapels an Tag 7 nach Injektion der PC14-PE6-dsRed2 Tumorzellen (rot). Mikroglia (grün) in der Umgebung erscheinen normal in ihrem Abtastverhalten im Vergleich zu den Makrophagen im Tumor, die ein größeres Zytoplasma und weniger Feinprozesse haben. Maßstabsbalken 100 µm.



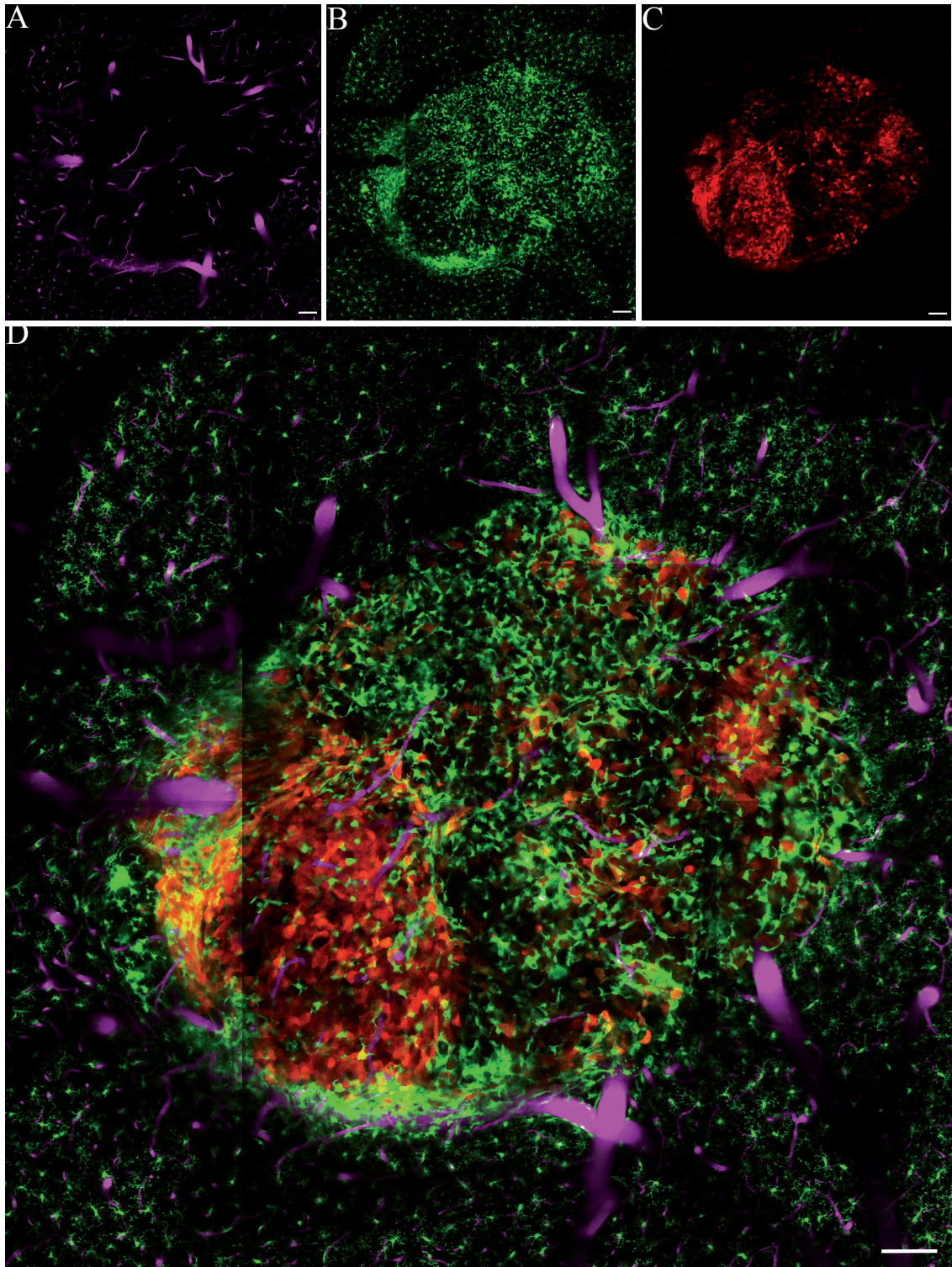
aktivierten, amöboiden Form. Im Bereich des Tumors erscheinen alle Mikroglia/Makrophagen in amöboider Form ohne das für ruhende Mikroglia typische Abtastverhalten, die Dichte ist sichtbar erhöht (Abb. 26). Etwa 10-15 % der Tumordinjektionen wachsen nicht zum Tumor heran (Abb. 27).

Nach intravenöser Injektion des nahinfraroten Blutfarbstoffs Evans Blue lassen sich Mikroglia/Makrophagen, Tumorzellen und Blutgefäße gleichzeitig mit einer Anregungswellenlänge (z.B. bei 920 nm) darstellen (Abb.28). Alle drei Fluorophore sind ausreichend hell um eine gute Bildqualität zu erreichen. Evans Blue zeigt allerdings auch Signal im roten Kanal und tritt im Tumor aus Gefäßen aus. Da es auch im Gewebe und an Gefäßwänden verbleibt, eignet sich



**Abbildung 27: Mikroglia beim Rückgang eines Tumors**

In etwa 10-15% der Tumorzellinjektionen wächst kein Tumor an. Meist bleibt eine Größenzunahme des Tumorbereichs in den ersten 14 Tagen aus, nach 14-21 Tagen sind in der Regel keine Tumorzellen mehr sichtbar. Mikroglia in der Umgebung des Tumors erscheinen normal. Im Bereich des verschwundenen Tumors sind nach 21 Tagen noch deutlich mehr amöboide Mikroglia/Makrophagen sichtbar. Nach 28 Tagen ist der Randbereich der Tumornarbe bereits wieder deutlich weniger besiedelt und die Feinprozesse der Mikroglia erscheinen normal. Maßstabsbalken 100 µm.



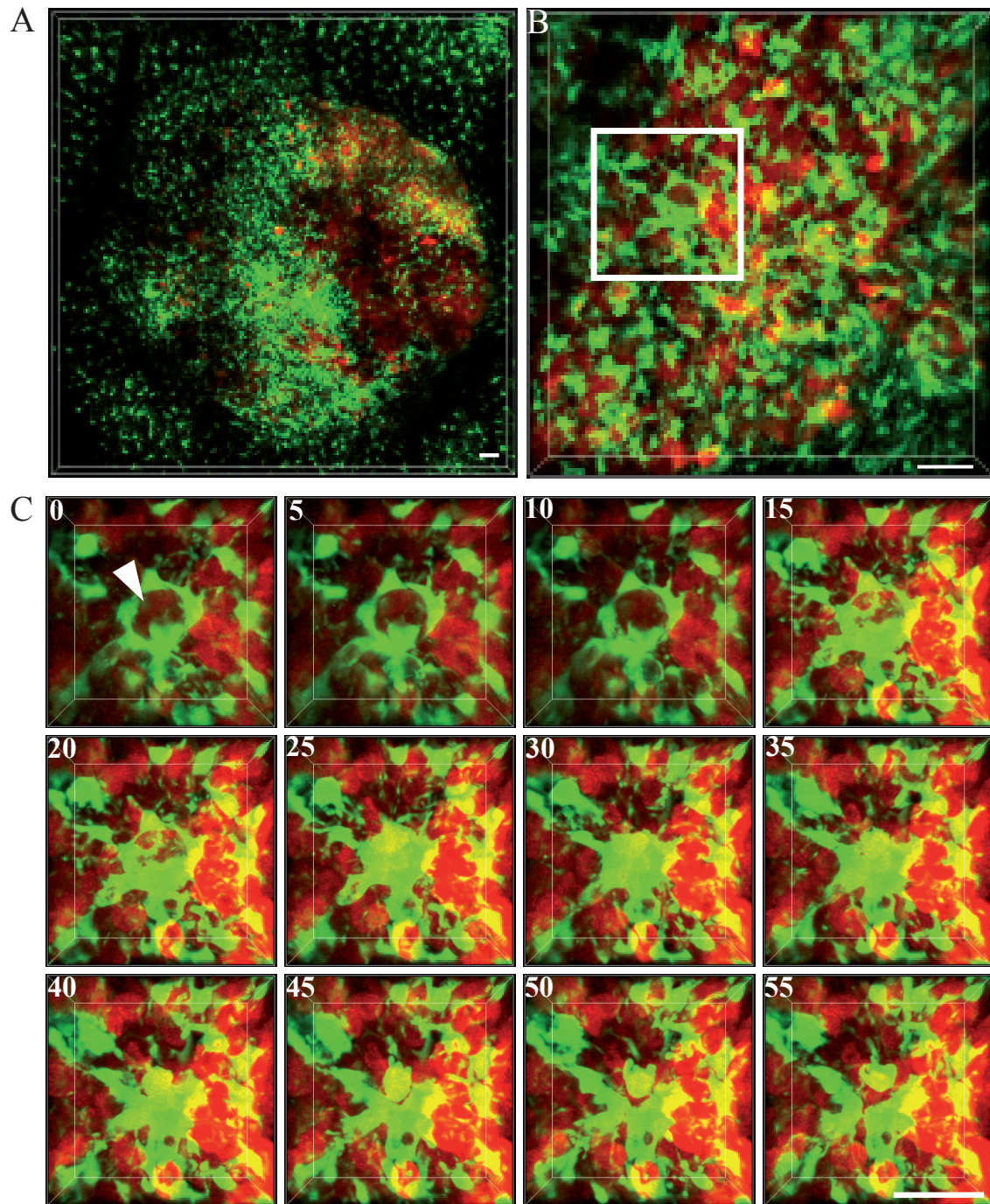
**Abbildung 28: Dreifarbendarstellung von Blutgefäßen, Mikroglia und Tumorzellen in vivo.**

In dieser Aufnahme wurden 3 Fluorophore gleichzeitig in vivo mit einer Wellenlänge (920 nm) angeregt. Einzelne Schnittebene einer 4x4 Tile-Scan Aufnahme an Tag 23 nach Injektion der Tumorzellen.

A: Blutgefäße nach Evans Blue Injektion, B: GFP-Mikroglia, C: dsRed2-PC-14E6 Tumor nach Subtraktion von Kanal A.

D: Überlappende Darstellung aller drei Kanäle. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .





**Abbildung 29: Zeitserie von Makrophagenbewegungen innerhalb eines Tumors.**

A: Typischer Bildausschnitt eines Zeitpunktes von einer Zeitserie aus einer Region von  $1275 \times 1275 \times 50 \mu\text{m}$ .  
 B: 3D Ansicht eines  $50 \mu\text{m}$  tiefen Stapels aus einer Tumorregion. Der weiße Kasten markiert die Region in C.  
 C: Zeitserie über 60 Minuten. Makrophagen umringen eine Tumorzelle (Pfeil) mit vergrößerten Zytoplasma. Ab Minute 45 ist die Tumorzelle nicht mehr zu sehen, die Makrophagen entfernen sich von der Position ab Minute 50. Maßstabsbalken  $50 \mu\text{m}$ .

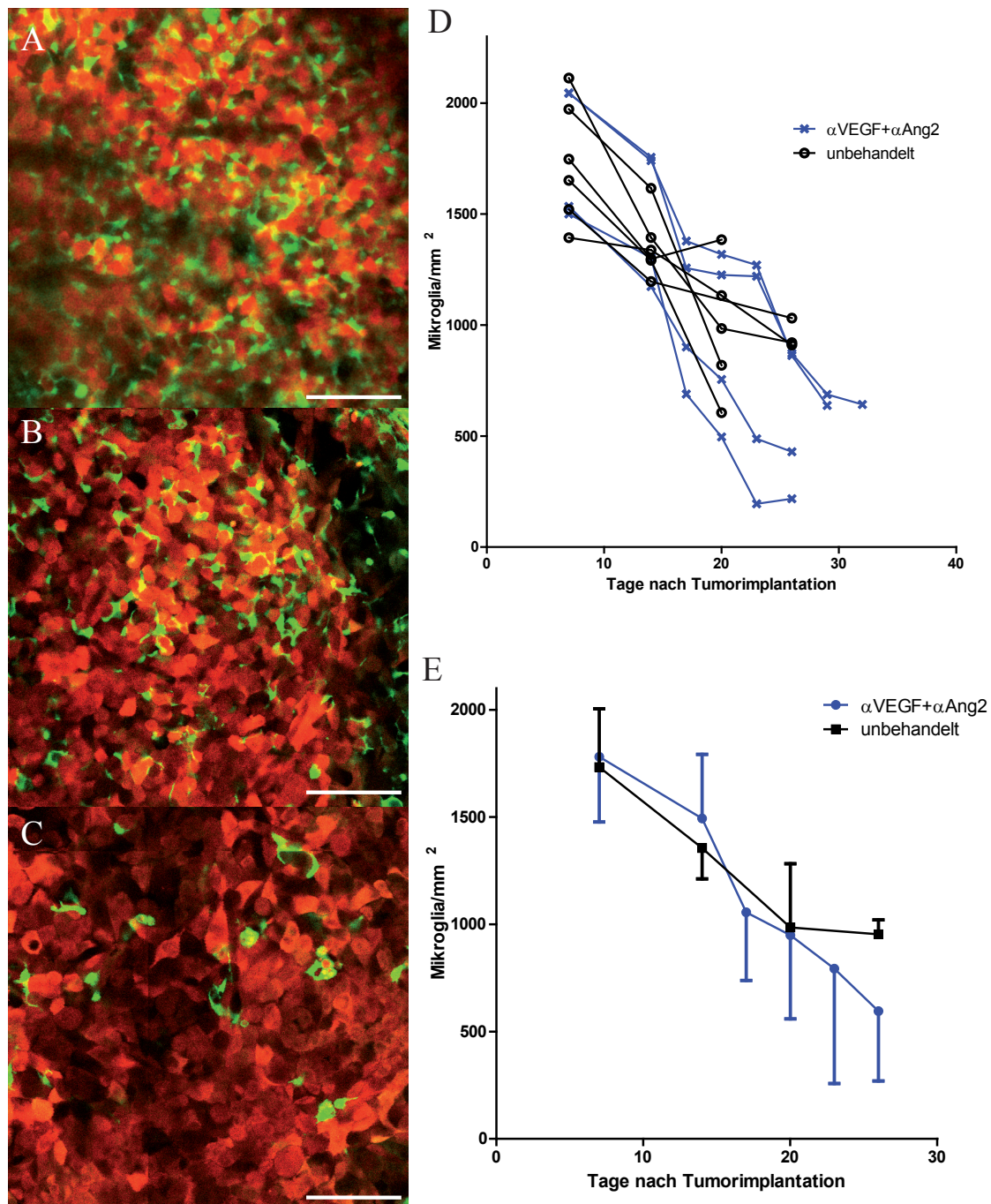


Evans Blue nicht zur wiederholten Anwendung in der Intravitalmikroskopie und sollte deshalb nur beim letzten Zeitpunkt einer Versuchsreihe verwendet werden.

Weiterhin sind auf diese Weise Zeitrafferaufnahmen der Bewegungen von Makrophagen innerhalb des Tumors möglich. Aufnahmen von mehreren 50 µm tiefen Stapeln alle 5 Minuten über eine halbe Stunde haben sich als praktikabel erwiesen (Abb. 29). Ein häufig zu beobachtendes Ereignis ist das Umringen einer Tumorzelle mit vergrößertem Zytoplasma durch mehrere Makrophagen. In der Regel ist während einer halben Stunde keine große Veränderung zu beobachten. In einer längeren Aufnahme von einer Stunde konnte festgehalten werden wie mehrere Makrophagen eine Tumorzelle phagozytieren (Abb. 29C).

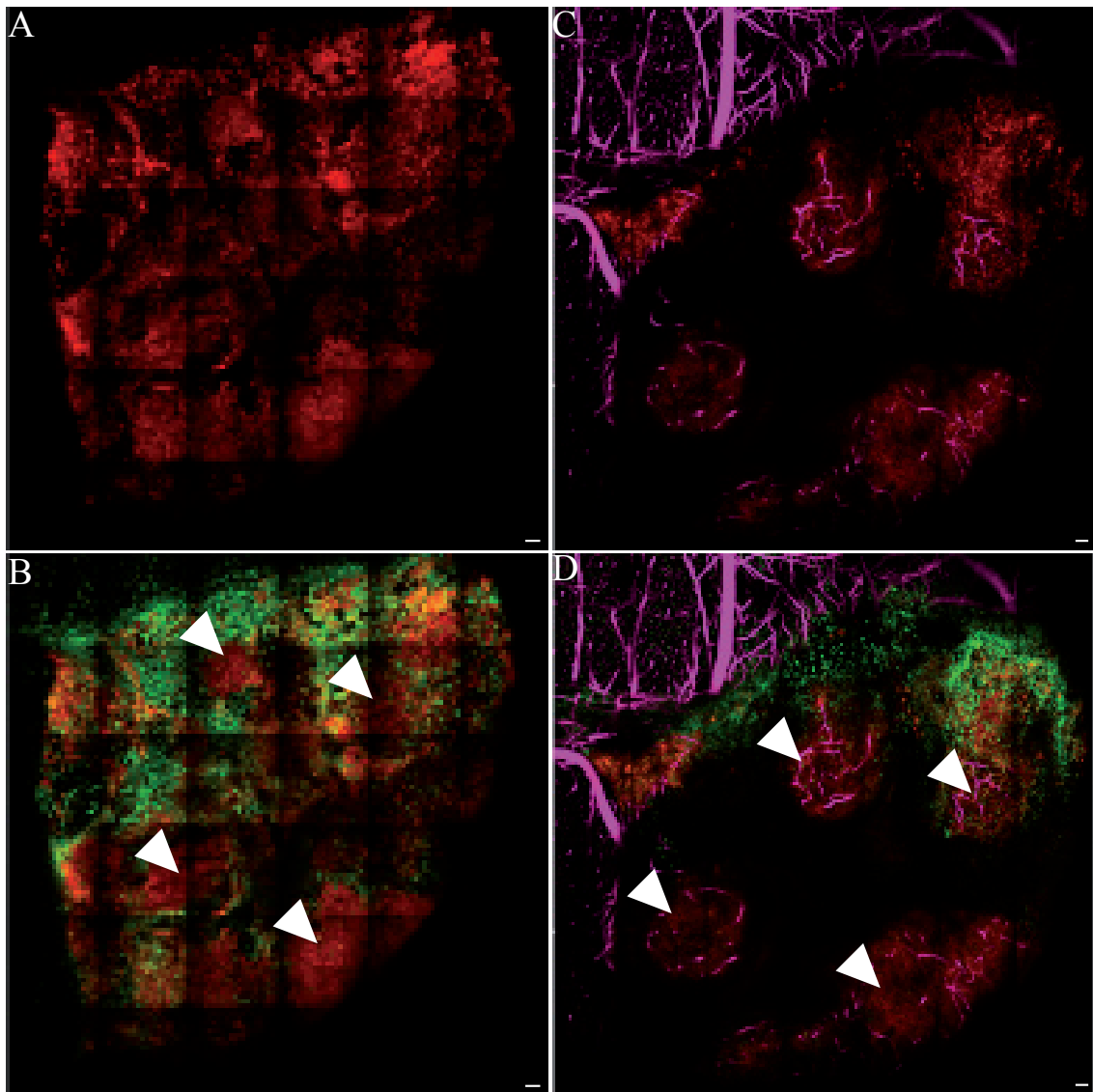
Um den Einfluss der antiangiogenen Behandlung auf die Anzahl der Mikroglia zu untersuchen, wurden 6 unbehandelte Tiere, sowie 4 mit anti-VEGF und anti-Angiopoietin-2 behandelte Tiere verglichen (Abbildung 30). Die Verteilung der Mikroglia ist jedoch häufig nicht gleichmäßig über den Tumor, sondern es sind in der Regel Regionen mit höherer oder niedriger Mikroglia-dichte zu sehen. In beiden Gruppen konnte ein Abfall der Mikroglia-dichte im Zeitverlauf beobachtet werden von im Mittel  $1781 \pm 304$  bzw.  $1733 \pm 271$  Mikroglia pro  $\text{mm}^2$  an Tag 7 zu  $1493 \pm 299$  bzw.  $1355 \pm 143$  Mikroglia pro  $\text{mm}^2$  an Tag 14. Am Tag 6 der Behandlung (Tag 21 nach Injektion) konnten keine Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe ( $948 \pm 389$  Mikroglia/ $\text{mm}^2$ ) und den Kontrolltieren ( $985 \pm 297$  Mikroglia/ $\text{mm}^2$ ) beobachtet werden. Am Tag 12 der Behandlung zeigten die behandelten Tiere eine niedrigere mittlere Mikroglia-dichte ( $595 \pm 325$  Mikroglia/ $\text{mm}^2$ ) im Tumor als die Kontrolltiere ( $953 \pm 67$  Mikroglia/ $\text{mm}^2$ ), jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,12$ ;  $n = 4$  behandelte Tiere, 3 überlebende Kontrolltiere an Behandlungstag 12).

Ein Grund für den niedrigeren Mikroglia-dichte der Behandlungsgruppe ist der lokale Rückgang von Tumorzellen in Regionen hoher Mikroglia-dichte (Abb. 31, 32). Bei großen Tumoren ( $>3$  mm) konnte ein lokaler Rückgang von Tumorzellen in avaskulären Regionen beobachtet werden. Regionen mit hoher Mikroglia-dichte sind davon betroffen. Regionen mit geringer Mikroglia bleiben dagegen zusammen mit den Blutgefäßen erhalten. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die Mikroglia-dichte in solchen Regionen bereits zu Beginn der Behandlung niedrig war und lediglich während der Behandlung erhalten blieb, während Regionen hoher Mikroglia-dichte avaskulär und atumoral wurden. Am Tag 9 wurde solchen Tieren zusätzlich Evans Blue zur Blutgefäßdarstellung verabreicht. Blutgefäße waren vor hauptsächlich in Tumorregionen mit geringer Mikroglia-dichte zu sehen und erscheinen normalisiert (Abb. 32).



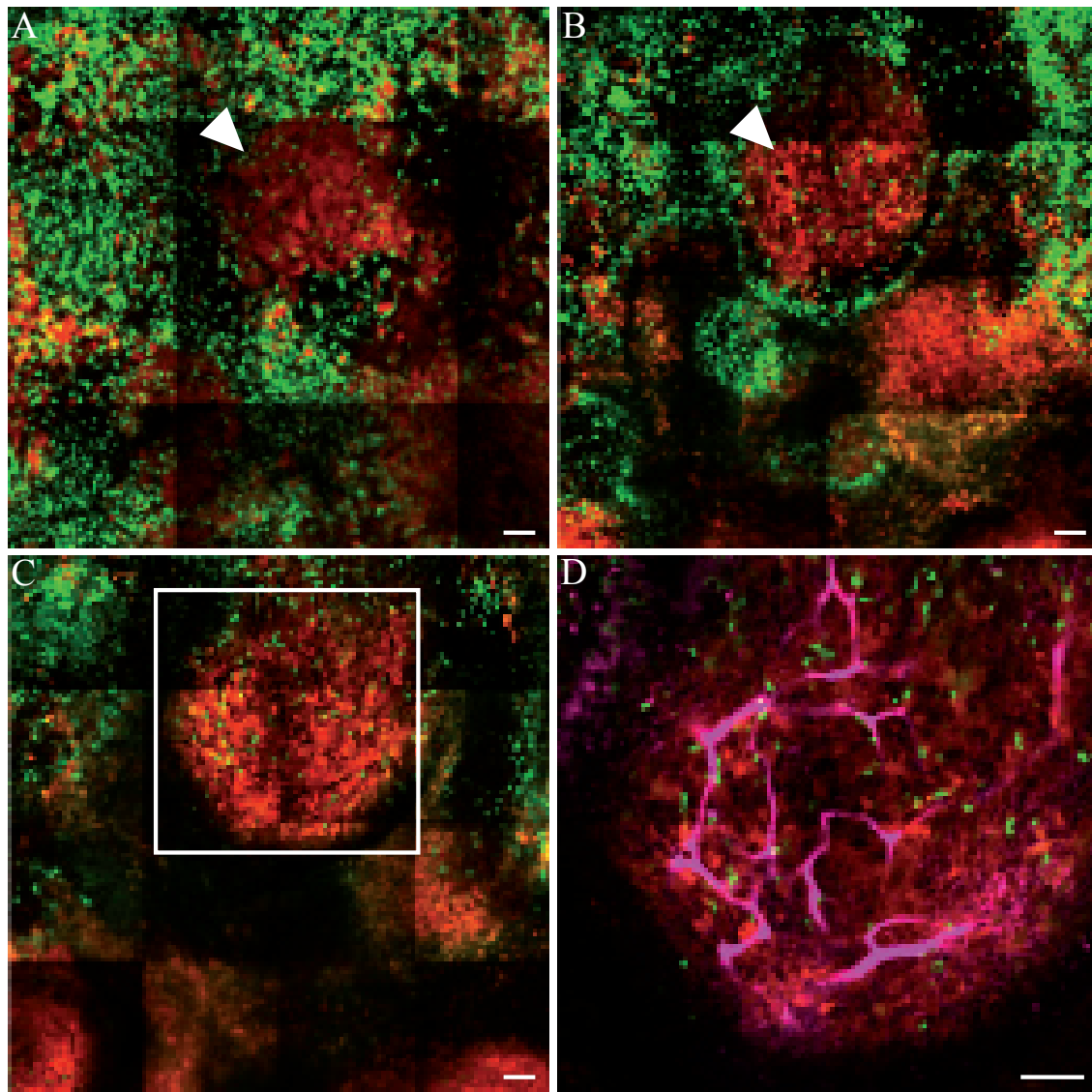
**Abbildung 30: Mikroglija/Makrophagedichte im Zeitverlauf**

A: Beispiel für hohe Makrophagedichte an Tag 7. Eine hohe Makrophagedichte verschlechtert die Bildqualität. B: Region geringerer Makrophagedichte an Tag 21 eines behandelten Tieres (gegen VEGF und Ang2). C: Region sehr niedriger Mikrogliadichte an Tag 27 eines behandelten Tieres (gegen VEGF und Ang2). D: Verlauf Mikrogliadichte pro Quadratmillimeter für alle einzelnen Tiere, n = 4, 6 Tiere. E: Mittlere Mikrogliadichten pro Quadratmillimeter im Zeitverlauf. An Tag 26 wird keine signifikante Reduktion zwischen der Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe erreicht ( $p = 0,12$ ). n = 4, 6 Tiere, noch n = 3 Kontrolltiere überlebend an Tag 26. Fehlerbalken als Standardabweichung dargestellt. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.



**Abbildung 31: Mikrogliadichte, vaskuläre Normalisierung und lokaler Tumorzellrückgang**

A, B: Tag 17 nach Tumorzellimplantation, Tag 3 der Behandlung mit  $\alpha$ -VEGF und  $\alpha$ -Angiopoietin-2. Der Tumor (rot) hat noch keine nekrotischen Regionen. Es existieren bereits Regionen (Pfeilspitzen) mit einer lokalen geringeren Mikrogliadichte (grün). C, D: Tag 23 nach Tumorzellimplantation, Tag 9 der Behandlung mit  $\alpha$ -VEGF und  $\alpha$ -Angiopoietin-2. Der Tumor ist in kleine Stücke zerfallen, dazwischen avaskuläre, nekrotische Regionen ohne Tumorzellen. Regionen, die in B bereits eine geringe Mikrogliadichte aufzeigen, bleiben erhalten. Blutgefäße (Evans Blue, in magenta) verbleiben in diesen Regionen und erscheinen normalisiert. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.



**Abbildung 32: Lokale Mikroglia-dichte und vaskuläre Normalisierung**

Die Abbildung zeigt eine Region des Tumors aus Abb. 31.

A: Tag 17 nach Tumorzellimplantation, Tag 3 der Behandlung mit  $\alpha$ -VEGF und  $\alpha$ -Angiopoietin-2. Die Pfeilspitze deutet auf eine Region mit geringer Makrophagendichte, ringsum im Tumor sind viele Makrophagen zu sehen.

B: Tag 20 nach Tumorzellimplantation, Tag 6 der Behandlung mit  $\alpha$ -VEGF und  $\alpha$ -Angiopoietin-2. Die Tumorregion mit niedriger Makrophagendichte ist etwas größer geworden, ringsum bilden sich erste nekrotische Bereiche ohne Tumorzellen und Makrophagen.

C: Tag 23 nach Tumorzellimplantation, Tag 9 der Behandlung mit  $\alpha$ -VEGF und  $\alpha$ -Angiopoietin-2. Nun ist außerhalb der Region mit niedriger Makrophagendichte ein großer Teil des Tumors nekrotisch.

D: Ausschnitt aus C (weißes Quadrat) nach Injektion von Evans Blue. Nur im verbleibenden Tumorbereich sind noch Gefäße vorhanden. Blutgefäße erscheinen normalisiert. Maßstabsbalken 100  $\mu$ m.

## 5 Diskussion

### 5.1 Neurotax: Optische Biopsie zur molekularen Diagnostik in der Neurochirurgie

Glioblastome sind verheerende, unheilbare Tumorerkrankungen des Gehirns, die innerhalb weniger Monate zum Tode führen. Trotz jahrzehntelanger Forschung konnte die durchschnittliche Überlebensdauer der Patienten, verglichen mit den Behandlungsmöglichkeiten vor 30 Jahren, gerade einmal um 2 Monate verlängert werden. Innovative und vor allem individuelle Behandlungsoptionen werden benötigt, um Patienten eine Perspektive zu geben. Eine Biopsie des Tumors ist derzeit noch das wichtigste Mittel zur Diagnose eines Glioblastoms. Die Wahl der Behandlung wird gerade in der Zukunft noch bedeutender von dem für jeden Tumor individuellen, genetischen Profil und von der molekularen Diagnostik abhängen. Deshalb werden minimal-invasive chirurgische Biopsien von Tumoren in der Zukunft stark an Bedeutung gewinnen, nicht nur bei Gehirntumoren. Das Projekt Neurotax zielt darauf ab, derartige Eingriffe durch fluoreszenzbasierende optische Unterstützung zu verbessern. Zum Einen, um durch die Detektion von Blutgefäßen Blutungen und die damit verbundenen Komplikationen zu vermeiden, zum Anderen, um den Ursprung des erhaltenen Gewebes vor der Entnahme abzusichern und damit das Risiko einer fehlerhaften Charakterisierung oder einer Wiederholung des Eingriffs zu minimieren.

#### 5.1.1 Fluoreszenzbasierende Unterstützung bei der Diagnostik von Tumoren

In dieser Arbeit wurden experimentelle Glioblastome im Mausmodell mit 5-ALA-induzierter PpIX-Fluoreszenz mit einer endoskopischen Sonde erfolgreich dargestellt. 5-ALA war eine naheliegende Wahl zur Tumormarkierung, da es zum einen bereits in der Klinik für eine sehr ähnliche Anwendung zugelassen ist und zum anderen bekannt ist, dass es einen großen Teil hochmaligner Tumoren spezifisch und sensitiv markiert. Trotz der geringen Größe von 131 Da, kann 5-ALA nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Ennis et al., 2003). Die Aufnahme von 5-ALA in Gehirntumoren kann also nur verstärkt erfolgen, wenn die Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigt ist, was bei Glioblastomen zutrifft. Es bleibt abzuwarten, inwiefern antiangiogene Therapien, aktuell relevant im Falle von Avastin, eine einschränkende Wirkung auf die Aufnahme von 5-ALA haben. In der Regel wird aber ein chirurgischer Eingriff vor einer antiangiogenen Therapie durchgeführt. Im Mausexperiment der vorliegenden Arbeit konnte die sondenbasierte Detektion von humanen Glioblastomzellen durch systemische Applikation von 5-ALA gezeigt werden. Ein ähnlicher Ansatz zur Absicherung der Herkunft der Gewebeprobe wird von Widhalm et al. bereits in der Klinik angewandt (Widhalm et al., 2012). Hierbei wird dem Patient ebenfalls 5-ALA vor der Biopsie verabreicht um den Ursprung der Gewebeprobe durch PpIX Fluoreszenz zu verifizieren. Eine Überprüfung der Gewebeprobe auf Fluoreszenz findet allerdings nach Entnahme der Probe unter einem Fluoreszenzmikroskop statt. Eine starke Fluoreszenz wurde neben Glioblastomen auch in hochgradigen Gliomen und Lymphomen beobachtet, wenn



diese eine ringförmige Kontrastverstärkung im MRT zeigten. Gewebe mit starker Fluoreszenz entstammte zu 100% aus einem hochgradigen Tumor (Glioblastom, hochgradigem Gliom oder Lymphom). Es wird ebenfalls beschrieben, dass neben den Proben mit sehr starker Fluoreszenz auch Proben mit schwacher oder vager Fluoreszenz auftreten. Dieses Signal kann von Metastasen stammen, niedriggradigen Gliomen oder dem infiltrativen Rand von Glioblastomen. Die Unterscheidung zum nekrotischen Gewebe im Kern von Glioblastomen war jedoch eindeutig, alle Glioblastome zeigten im nekrotischen Gewebe keine PpIX-Fluoreszenz. Aus dieser Studie lässt sich schlussfolgern, dass ein starkes Fluoreszenzsignal mit sehr hoher Spezifität hochgradigem Tumorgewebe entstammt, während die Abwesenheit eines Fluoreszenzsignals im Kern eines solchen Tumors (Lokalisation basierend auf MRT Aufnahmen) nekrotisches Gewebe anzeigt. Umgekehrt kann man jedoch aus schwachen oder abwesenden Fluoreszenzsignalen keine verlässlichen Schlüsse über das Gewebe ziehen. In solchen Fällen wäre weiterhin eine Bestätigung durch einen intraoperativ anwesenden Neuropathologen nötig. Aufgrund dieser Studie eignet sich die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Herangehensweise zur optischen Unterstützung von Biopsien uneingeschränkt für die Anwendung zur Diagnostik von Glioblastomen.

Die Ergebnisse der ersten Anwendung der Neurotax-Sonde an einem humanen Patienten bestätigten dies ebenfalls. Das Fluoreszenzsignal von gesundem Gewebe, Tumorgewebe und nekrotischem Gewebe korrelierte exakt mit dem histologischen Befund. Die Anwendung der Sonde mit 5-ALA könnte somit stereotaktische Eingriffe verkürzen und absichern, da sobald eine Region mit starker Fluoreszenz gefunden wird, mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Gewebeprobe gewonnen werden kann, die eine eindeutige histologische und molekularbiologische Analyse garantiert. Ebenso kann dann eine nekrotische Region, durch Abwesenheit des Signals, schon zum Zeitpunkt des Vorschubs der Sonde identifiziert werden.

Die Markierung von Tumorzellen durch 5-ALA eignet sich sehr gut zur Markierung von hochgradig malignen Tumoren. Unsicher ist, inwiefern sich niedriggradige Tumoren oder Metastasen über PpIX-Fluoreszenz darstellen lassen. Wahrscheinlich jedoch ist diese Art der Markierung zumindest für niedriggradige Tumore nicht geeignet (Johansson et al., 2010). Da niedriggradige Gliome jedoch keine Nekrose aufweisen, ist die Gefahr der Gewinnung einer diagnostisch nicht aussagekräftigen Biopsie nicht relevant. Die Anwendung der Neurotax-Sonde ist jedoch nicht auf die Tumormarkierung mit 5-ALA-induziertem PpIX beschränkt. Gerade die Experimente zur Darstellung von Fluorescein in Blutgefäßen bieten eine gute Basis zur Anwendung mit weiteren, spezifischeren Markern zur Tumordetektion. Die Markierung von Antikörpern, Peptiden oder kleinen organischen Molekülen mit Fluorescein oder dessen Derivaten wie Alexa 488 oder Cy3 ist präklinisch bereits eine häufig angewandte Technik. In der Tat gibt es bereits erste Ansätze derartige Methoden in der Klinik anzuwenden. So konnte beispielsweise FITC-gekoppeltes Folat, intravenös appliziert als Markierung für epithelialen Eierstockkrebs verwendet werden (van Dam et al., 2011). Etwa 90-95% der Fälle von Eierstockkrebs überexprimieren den Folatrezeptor- $\alpha$  und können auf diese Weise bei operativen Resektionen markiert werden. Derartige Antikörpermarkierungen können sowohl in der Diagnostik als auch in der Chirurgie verwendet werden. Weiterhin wurde zur endoskopischen Diagnostik von Speiseröhrenkrebs ein FITC-markiertes Peptid zur lokalen Anwendung in der Speiseröhre beschrieben (Sturm et al.,



2013). Generell sind jedoch Farbstoffe im nahinfraroten Wellenlängenbereich aufgrund besserer Gewebepenetration und geringer Absorption theoretisch besser für eine fluoreszenzbasierte Diagnostik geeignet. Die Neurotax-Sonde ist in der Lage im nah-infraroten Wellenlängenbereich zu detektieren und unterstützt somit auch neue Entwicklung in diesem Bereich.

### **5.1.2 Fluoreszenzbasierende Früherkennung von Blutgefäßen bei Biopsien**

Indocyaningrün (ICG) wird bereits seit 1975 in der Augenheilkunde angewandt um Blutgefäße darzustellen. Dank technischer Weiterentwicklungen wird es seit einigen Jahren auch in offenen Operationen zur Darstellung von Gefäßen (Schaafsma et al., 2011) verwendet, darunter auch in der Neurochirurgie (Raabe et al., 2003). Fluorescein wird auch in der Augenheilkunde angewandt, es gibt ebenfalls eine Studie zur Blutgefäßdarstellung mit Fluorescein im Gehirn (Wrobel et al., 1994). Die spektralen Eigenschaften von ICG liegen mit Absorption und Emission bei 805 nm bzw. 835 nm in einem besonders günstigen Bereich zur Darstellung von Gefäßen im Gewebe. Weiterhin wird ICG mit einer Plasmahalbwertszeit von 4 Minuten über die Leber ausgeschieden (Raabe et al., 2003). Neben diesen Farbstoffen ist auch Methylenblau mit einem Emissionspeak bei 700 nm zur Anwendung am Menschen zugelassen (Schaafsma et al., 2011).

Im Mausmodell dieser Arbeit konnten mit ICG und der Neurotax-Sonde oberflächliche, große Gefäße des Gehirns dargestellt werden. Beim Vorschub der Sonde in das Gehirn hinein, gelang es aber nicht ein Blutgefäß mit ICG zu detektieren. Dies liegt auch daran, dass die Chance, in der Tiefe des Mausgehirns auf ein quer verlaufendes großes Gefäß zu treffen relativ gering ist. Der Kontrast der ICG-Darstellung war zwar ausreichend zur Darstellung oberflächlicher Gefäße, für tief liegende Gefäße gelang es jedoch in diesen Versuchen nicht. Problematisch ist auch die kurze Verweildauer von ICG im Blut. Vergleichbare klinische Biopsien im Gehirn dauern in der Regel ein bis zwei Stunden.

Erfolgreicher war die Darstellung von Gefäßen mit Fluorescein-Dextran. Sowohl kleine Kapillaren an der Oberfläche, als auch ein tiefliegendes, großes Gefäß konnten auf diese Weise endoskopisch dargestellt bzw. vorzeitig erkannt werden. Es wurden auch Techniken zur Bildverbesserung erprobt. Der Einsatz von GRIN-Linsen zur Erhöhung der Auflösung ermöglichte die Darstellung von selbst kleinsten Kapillaren. Allerdings wird dadurch auch der sichtbare Bildausschnitt verkleinert. Je nach Anwendung ist deshalb eine Vergrößerung durch GRIN-Linsen mehr oder weniger sinnvoll. Zur Detektion von Tumorregionen beispielsweise ist eine erhöhte Auflösung überhaupt nicht notwendig, hier ist ein größeres Sichtfeld nützlicher. Ebenfalls abhängig von der Anwendung ist der Einsatz der strukturierten Beleuchtung. Während die strukturierte Beleuchtung die Darstellung in der Fokusebene erheblich verbessert, wird durch die strukturierte Beleuchtung Licht aus größerem Abstand ausgeblendet. Deshalb eignet sich die strukturierte Beleuchtung nicht für eine sichere Abstandswarnung von Blutgefäßen im Weg der Sonde. Hierfür wäre ein einfacher Gauß-Filter erheblich nützlicher, da auf diese Weise die Bildqualität ebenfalls erheblich verbessert wird, aber kein Licht außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Für die weitere Anwendung der Blutgefäßdetektion in der Klinik wären neben der visuellen Bildgebung eine spektroskopische Messung und automatische Warnmeldungssysteme von Nutzen.

### 5.1.3 Präklinische und klinische Beurteilung der Ergebnisse und Ausblick

Die überzeugenden Versuche im Mausmodell ermöglichten eine unerwartet rasche Anwendung der Neurotax-Sonde in einem ersten klinischen Heilversuch. Dies wurde nicht zuletzt durch die Entwicklung des mit einem konventionellen stereotaktischen Eingriff kompatiblen Endoskops ermöglicht. Da mit 5-ALA ein bereits zugelassenes Diagnostikum eingesetzt wurde, lag die Schwelle zur Translation in die Klinik vergleichsweise niedrig. Durch die erfolgreiche Anwendung an einem Tumorpatienten sinkt die Notwendigkeit weitere präklinische Experimente mit 5-ALA markierten Tumormodellen durchzuführen, zumindest zur grundlegenden Anwendbarkeit der Sonde. Die tatsächliche Pathobiologie von Glioblastomen, insbesondere die mikrovaskuläre Proliferation, die invasiven und infiltrativen Tumorränder und der nekrotische Tumorkern sind in Mausmodellen ohnehin nur teilweise wiedergegeben. Weitere präklinische Experimente wären deshalb zu diesem Zeitpunkt von vergleichsweise geringem Nutzen, verglichen mit einer Patientenstudie. Da 5-ALA von vielen neurochirurgischen Kliniken zur Resektion (Stummer et al., 2006) oder photodynamischen Therapie (Stepp et al., 2007) eingesetzt wird, werden weitere klinische Daten von Patienten mit der Zeit zur Verfügung stehen. Die regulatorischen Hürden für eine Zulassung von 5-ALA zur Diagnostik von Hirntumoren erscheinen bewältigbar, da Verträglichkeit und Nebeneffekte bereits für die identische Patientengruppe bewertet wurden. Es bleibt zu zeigen, in Form einer klinischen Studie, dass der Einsatz von 5-ALA mit einer optisch unterstützenden Sonde einen Vorteil gegenüber der bisherigen Technik ohne optische Kontrolle bietet. Patienten könnten von der hohen Spezifität der Anwendung profitieren, da so erneute Eingriffe aufgrund einer fehlplatzierten Probenentnahme vermieden werden. Weiterhin könnte die Technik die Dauer der Eingriffe verringern, da das Fluoreszenzsignal verlässlich die richtigen Positionen anzeigt. Aus Sicht der präklinischen Forschung sind nun natürlich solche Experimente interessant, die weitere molekulare Ziele zur Unterscheidung von unterschiedlichem malignem Gewebe identifizieren. Ebenfalls von direkter Relevanz für die Klinik wären präklinische Experimente zur Gewebepenetration von 5-ALA nach antiangiogener Behandlung, analog zu ähnlichen Versuchen dieser Arbeit.

Die endoskopische Blutgefäßdarstellung wurde bisher nicht an Patienten getestet. Die Ergebnisse der präklinischen Versuche mit Fluorescein sind jedoch vielversprechend. Eine Verwendung von ICG zur Blutgefäßdarstellung findet bei einer Vielzahl von chirurgischen Eingriffen Anwendung (Polom et al., 2011). Der wichtigste Nachweis in diesem Projekt war die Detektion eines tiefliegenden Gehirntumors durch 5-ALA induzierte PpIX-Fluoreszenz. Da diese Substanz bereits auf ähnliche Weise von Neurochirurgen verwendet wird, besteht nur eine niedrige Schwelle zur Translation der Technik in den Operationssaal. Die zusätzliche Darstellung der Gefäße dagegen, ist den ausführenden Neurochirurgen prinzipiell etwas schwieriger zu vermitteln. Durch die Methode wäre es aber möglich, stereotaktische Biopsien aus Gewebe mit hoher Gefäßdichte abzusichern, indem große Gefäße vor der Zerstörung erkannt werden. Hierfür sind Methoden für eine Abstandswarnung von Blutgefäßen äußerst nützlich, insbesondere bei Eingriffen im Gehirn, da Komplikationen bei stereotaktischen Biopsien hauptsächlich durch Blutungen verletzter Gefäße verursacht werden.

Das in dieser Arbeit erstmals eingesetzte Endoskop liefert einen wichtigen Beitrag zur optischen Unterstützung stereotaktischer Eingriffe. Fluoreszenzbasierende Biopsie- und Chirurgieanwendungen gewinnen immer mehr an klinischer Bedeutung und werden in der Zukunft insbesondere im Bereich der Onkologie eine wichtige Rolle spielen (Keereweer et al., 2013).

## **5.2 Antiangiogene Therapie von Gehirnmetastasen: Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Dynamik der vaskulären Normalisierung durch Inhibition von VEGF und Angiopoietin-2**

### **5.2.1 Vorteile und Nachteile der Zweiphotonen-Mikroskopie mit chronischen kraniellen Fenster in der Krebsforschung**

Die in vivo Zweiphotonenmikroskopie mittels kranieller Fenster ist zum derzeitigen Stand der Technik die einzige Möglichkeit mehrere Zeitpunkte des Tumorwachstums im Gehirn mit subzellulärer Auflösung darzustellen (James & Gambhir, 2012; Sahai, 2007). Nicht-invasive Alternativen wie die Computertomographie (Auflösung: 50-200  $\mu\text{m}$ ) oder Magnetresonanztomographie (Auflösung: 25-100  $\mu\text{m}$ ) erreichen auch in präklinischen Versuchen nicht die Auflösung und die Aufnahmegeschwindigkeit der Zweiphotonenmikroskopie (James & Gambhir, 2012; Kauppinen & Peet, 2011). Die photoakustische Bildgebung (Wang & Hu, 2012) stellt eine neue, nicht-invasive Alternative mit hochauflösender Bildgebung und tiefer Gewebepenetration dar, die großes Potential in der Zukunft birgt, jedoch beeinträchtigt der massive Schädel die Anwendung am Gehirn. Die Zweiphotonenmikroskopie ist deshalb derzeit die Methode der Wahl, wenn Mechanismen auf zellulärer Ebene intravital untersucht werden sollen. Es gilt jedoch sorgfältig abzuwägen, ob die zu untersuchende Fragestellung nicht auch bereits in histologischen Schnitten beantwortet werden kann. Intravitalmikroskopie ist ungleich arbeitsaufwändiger, belastet die Versuchstiere stärker, benötigt entsprechende experimentelle Erfahrung und ist auf teure Geräte angewiesen. Ein starkes Argument für die Intravitalmikroskopie ist die Reduzierung der Zahl benötigter Versuchstiere, da jedes Tier für multiple Zeitpunkte zur Verfügung steht. Allerdings trifft dies nur für einen erfahrenen Experimentator zu, da man je nach Operationsgeschick durchaus zwischen 10 % und 50 % Verluste durch die Operationen einplanen muss. Deshalb ist es für viele gewöhnliche Fragestellungen nicht sinnvoll, Intravitaluntersuchungen durchzuführen. Von besonderem Interesse der Intravitalmikroskopie sind dynamische Vorgänge, in der vorliegenden Arbeit beispielsweise Blutfluss, Gefäßpermeabilität oder Mikroglodynamiken. Weiterhin insbesondere relevant für die präklinische Forschung ist das Erlangen von Daten eines Tieres im Verlauf der Behandlung. Gerade für die Untersuchung von transienten Effekten oder auftretenden Therapieresistenzen liefert die Intravitalmikroskopie Daten im Zeitverlauf, die derart klinisch nicht zugänglich sind. Insbesondere bei Tumorversuchen, bei denen häufig hohen Variabilitäten im Krankheitsverlauf auftreten, können chronische Untersuchungen glaubhafte und reproduzierbare Daten liefern. In dieser Arbeit werden beispielsweise Effekte der antiangiogenen Therapie im Zeitverlauf untersucht. Die optimale Behandlungsstrategie für

diese Behandlungen ist trotz Anwendung in der Klinik immer noch unklar, nicht zuletzt mangels verlässlicher hochauflösender Daten.

Es ist jedoch anzufügen, dass die Operation des kraniellen Fensters ein massiver operativer Eingriff ist, bei dem Verletzungen und Entzündungen durchaus Nebeneffekte und Artefakte erzeugen können. So finden sich immer wieder Veröffentlichungen, bei denen Zweifel über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufkommen. In dieser Arbeit wurde versucht, derartige Artefakte zu vermeiden, indem zwischen der Operation der Fenster und der Implantation der Tumore vier Wochen abgewartet wurde. Eine erwähnenswerte Alternative zu den Glasfensterkonstruktion ist die Verwendung von sogenannten „thinned skull“ Fenster (Drew et al., 2010; Xu, et al., 2007; Yang et al., 2010), bei denen der Schädelknochen nicht geöffnet wird, sondern lediglich soweit verschmälert wird bis das Gehirn mikroskopisch zugänglich ist. Da das Gehirn nicht freiliegt, werden Verletzungen und Entzündungsreaktionen weitgehend vermieden. Allerdings ist die Zahl der Aufnahmezeitpunkte auf weniger als 5 beschränkt und die Bildqualität, je nach Technik mehr oder weniger beeinträchtigt. Da bei den gängigen experimentellen Tiermodellen von Gehirntumoren in der Regel Tumorzellen durch den Einstich einer Nadel ins Gehirn eingebracht werden müssen, erübrigt sich die Anwendung der „thinned skull“ Technik für Tumorexperimente.

Ein bestehender Kritikpunkt an der Arbeit mit kraniellen Fenster besteht in der unterschiedlichen Physiologie der Gehirnoberfläche unter dem Fenster. Die Blutgefäße der Pia mater unterscheiden sich von den tiefen Gefäßen, die Blut-Hirn-Schranke ist hier nicht intakt. Es konnte jedoch bereits in Versuchen mit Mikroendoskopen gezeigt werden, dass die Abläufe der Tumorangiogenese in tiefen Regionen des Gehirns genauso ablaufen wie bei oberflächlichen Tumoren (Barretto et al., 2011).

Einschränkend für die Verwendbarkeit der Zweiphotonenmikroskopie in kraniellen Fenstern ist, dass in soliden Tumoren im Kortex, insbesondere wenn diese angiogenes Wachstum zeigen, die Bildqualität viel schneller abfällt als in vergleichbarem unbeeinträchtigtem Gewebe. Statt einer maximalen Tiefe von 600-700  $\mu\text{m}$ , wie in Fragenstellungen der Neurowissenschaften möglich, ist es selten sinnvoll Bilder tiefer als 300-400  $\mu\text{m}$  aufzunehmen. Die limitierte Darstellungstiefe ist auch ein Grund für eine Beschränkung auf Implantationsversuche, anstelle von transgenen Mausmodellen. Derzeit existiert kein transgenes Mausmodell, das reproduzierbare Tumore in einer zweiphotonenmikroskopisch beobachtbaren Region des Kortex entwickelt. Unabhängig davon sind die der Forschung zur Verfügung stehenden Gehirntumormodelle in der Maus verbesserungsbedürftig, allerdings unterscheidet sich die Intravitalmikroskopie hier nicht von konventionellen Experimenten. Direkte Tumorzellinjektionen ins Gehirn bieten eine robuste Methode, um in einem großen Prozentsatz der Versuchstiere beobachtbare Tumore zu erhalten. Es werden zwar die frühen Schritte der Metastasierung, die Intravasation und Extravasation umgangen, allerdings zu Gunsten der Anzahl an auswertbaren Versuchstieren. Alternative Methoden mit Injektionen ins Herz oder in die Halsschlagader, welche gesamte Kaskade der Metastasierung möglicherweise besser reflektieren, führen zu einer erheblich geringeren Zahl an beobachtbaren Tieren. Die Durchführung von intravitalen Behandlungsstudien in solchen Modellen ist ungleich arbeitsaufwändiger und benötigt mehr Versuchstiere.

Zusammenfassend bietet die Intravitalmikroskopie mit kraniellen Fenstern in Tumormodellen des Gehirns einzigartige Möglichkeiten dynamische Effekte erstmals zu erkennen und zu beschreiben. Der große experimentelle Aufwand und mögliche artifizielle Effekte sollten die Anwendung jedoch auf spezifische, sorgfältig geplante Fragestellungen beschränken.

### **5.2.2 Etablierung der in vivo 3D Tile-Scan Technik zur chronischen Untersuchung von Gehirntumoren im Mausmodell**

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Aufnahmetechnik der chronischen Untersuchungen von Tumoren im Mäusegehirn weiterentwickelt und verbessert. Um mit geringer Laserleistung gute Aufnahmen zu erzielen, werden für Intravitaexperimente optimalerweise 20x-Wasserimmersionsobjektive mit einer numerischen Apertur von mindestens 1,0 verwendet. Dies schränkt die beobachtbare Fläche einer Aufnahme auf etwa 420 x 420  $\mu\text{m}$  ein. Ein 10x-Objektiv mit geringer numerische Apertur bringt Nachteile, da zwar ein größerer Bildausschnitt beobachtet werden kann, jedoch deutlich weniger Photonen vom Detektor gesammelt werden. Die Verwendung einer geringeren Apertur benötigt mehr Laserleistung, und führt deshalb zu mehr Phototoxizität durch das Anregungslicht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden pro Tier bis zu vier verschiedene Regionen eines Tumors über die Zeit verfolgt. Zur erneuten Lokalisierung der Aufnahme Regionen wurden dabei charakteristische große Blutgefäße der Gehirnoberfläche aufgenommen und das Koordinatensystem des motorisierten Tisch als Orientierungshilfe verwendet. Insbesondere die Blutgefäßmarkierung mit Fluorescein-Dextran oder anderen Farbstoffen erleichtert das Wiederauffinden der Regionen erheblich. In Tieren ohne Tumor ist das wiederholte Aufnehmen identischer Regionen mit diesen Techniken relativ unproblematisch. In Tieren mit Tumoren, insbesondere sobald diese Größen von mehr als 2 mm erreichen, ist das Wiederfinden der Aufnahmebereiche erheblich schwieriger. Nicht selten wurde ein erheblicher Teil der zur Verfügung stehenden Aufnahmezeit (idealerweise nicht länger als eine Stunde pro Tier und Zeitpunkt) zum Auffinden der Regionen benötigt. Wesentliche Schwierigkeiten hierbei waren die starken Veränderungen der Blutgefäße durch die Tumorangiogenese, die eine Orientierung anhand der Gefäße verhinderten. Vor allem bei unbehandelten Tieren stellte dies ein erhebliches Hindernis dar, hier war man vor allem auf das Koordinatensystem angewiesen. Weiterhin können durch die Raumforderung des wachsenden Tumors Verschiebungen des Gehirns auftreten, die das Koordinatensystem verfälschen. Eine weitere Schwierigkeit liegt im Größenzuwachs des Tumors in Richtung des Deckglases. Es kommt vor, dass eine zuvor aufgenommene Regionen beim nächsten Zeitpunkt 100  $\mu\text{m}$  und mehr unter einer neu entstandenen Tumorschicht liegt.

Um die Qualität der erhobenen Daten zu verbessern, wurde im Zuge dieser Arbeit eine Methode zur Aufnahme eines möglichst großen Bereichs des Tumors entwickelt. Dazu wurde eine Maushalterung mit zwei Freiheitsgraden der Rotation eingesetzt, die es ermöglicht 4x4 Tile-Scans mit einem 7MP Mikroskop einzusetzen. Diese Halterung ist unerlässlich, um die Gehirnoberfläche senkrecht zur optischen Achse auszurichten und Aufnahmen mit möglichst wenig Höhenunterschied über die Gesamtbreite des Tumors zu erhalten. Mit dieser Technik



wurden in der Regel Aufnahmen von 1,7 x 1,7 mm erstellt, ausreichend um kleinere Tumoren zumindest in X- und Y-Dimension vollständig hochauflösend aufzunehmen. In der Z-Dimension beschränkt die Bildqualität im Tumor die Aufnahmetiefe unverändert auf etwa 300 µm. Diese Methode stellt in folgenden Gesichtspunkten eine wesentliche Verbesserung der zuvor verwendeten Methode dar: Erstens, beträgt die Aufnahmezeit immer lediglich 20-45 Minuten (je nach Größe und Ebenenabstand in der Z-Dimension). Diese Zeit wird ansonsten aufgewandt, um Regionen wiederaufzufinden und kann nun für weitere Aufnahmen am gleichen Untersuchungstag genutzt werden. Zweitens, ist das untersuchte Volumen nicht nur größer, es ist auch möglich einen vollständigen Tumor zu untersuchen und nicht nur willkürlich ausgewählte Regionen. Dies ist insbesondere für Tumoren mit einer sehr großen Heterogenität, wie den hier verwendeten Gehirnmastasen eine bedeutende qualitative Verbesserung der erhobenen Daten. Drittens, ist man nicht mehr zwingend auf Blutgefäßmuster angewiesen, um die Regionen wiederaufzufinden. Gerade bei der Untersuchung der Angiogenese spielt dies durch die Veränderungen der Blutgefäße eine Rolle und erschwert die Durchführung erheblich. Einschränkungen bei der Durchführung der Tile-Scan Technik sind Kosten und der Aufwand für jeweils eine einzelne Maushalterung für jede parallel untersuchte Maus, sowie die Notwendigkeit während eines Versuchszeitraums keine Veränderungen am Mikroskopisch vorzunehmen. Weiterhin benötigt eine gute Ausrichtung der Tischachsen Erfahrung, Fingerspitzengefühl und Geschick. Techniken zur automatischen Ausrichtung der Gehirnoberfläche sind äußerst hilfreich (Scheibe et al., 2011), sind aber kostspielig und in der Regel nicht mit kommerziellen Mikroskopen kompatibel. Die Erstellung derart großer Datensätze stellt auch hohe Ansprüche an automatisierte Auswertungsmethoden. Zusammenfassend bietet die in vivo 3D Tile-Scan Methode eine elegante Lösung für jeden Untersuchungszeitpunkt größere Datensätze aus jedem einzelnen Versuchstier zu gewinnen. Insbesondere bei Untersuchungen in Gehirnmastasenmodellen mit großen regionalen Unterschieden kann dies eine qualitative Verbesserung der erhobenen Daten erwirken.

### 5.2.3 Antiangiogene Monotherapie von Gehirnmastasen

Im ersten Teil dieses Projektes wurden grundsätzliche Parameter der Effekte einer antiangiogenen Behandlung untersucht. Die wichtigsten Parameter für eine präklinische Beurteilung derartiger Experimente sind das Gesamtüberleben und die Tumorgöße. In diesem Versuch wurden zwei Antikörperbehandlungen gegen VEGF und Angiopoietin-2 jeweils alleine und als Kombination gemeinsam verglichen. Es wurde eine Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht alle drei Tage gewählt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen untersuchen zu können. Eine ähnliche Studie (Koh et al., 2010) untersuchte Antikörperdosen zwischen 5 mg/kg und 50 mg/kg und kam zu dem Schluss, dass ab einer Dosis von 25 mg/kg keine weitere Verbesserung der relevanten Parameter messbar war. Um einen Zusatznutzen der gleichzeitigen Therapie gegen VEGF und Angiopoietin-2 zu untersuchen, wurde deshalb eine etwas geringere Dosis gewählt. Werte von 10 mg/kg oder 25 mg/kg Körpergewicht wurden in anderen Studien verwendet (H. Huang et al., 2011; Koh et al., 2010). Die Behandlungen wurden ab einem Tumordurchmesser von 1,5 mm begonnen, so dass alle Tumore etwa gleich fortgeschritten waren und bereits pathologische



Blutgefäße aufwiesen. Tiere die keine Therapie erhielten, starben sehr früh, in der Regel waren weniger als die Hälfte der Tiere zum dritten Mikroskopiezeitpunkt an Tag 6 noch für Aufnahmen verfügbar. In den Gruppen, die nur einen der beiden Antikörper erhielten, lebten nur jeweils zwei von fünf Tieren deutlich länger als die unbehandelten Tiere. Tiere der Gruppen, die mit beiden Antikörpern behandelt wurden, lebten dagegen deutlich länger als die unbehandelten Tiere. Dieses Muster konnte auch in den weiteren Versuchen dieser Arbeit beobachtet werden. In der Regel war in allen Experimenten dieser Arbeit die Erhebung von Daten aus unbehandelten Tieren erschwert, aufgrund der vielen Tiere, die früh aus dem Versuch ausschieden. Bei den mit beiden Antikörpern behandelten Tieren war es dagegen möglich, 14 Tage und länger Daten zu erheben. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine antiangiogene Behandlung das Überleben der Tiere verlängert. Eine Behandlung gegen VEGF als auch Angiopoietin-2 bei einer Dosis von 5 mg/kg bewirkte dies aber nur bei einem Teil der Tiere. Die gleichzeitige Gabe zeigte sowohl bei einem großen Teil der Tiere Wirkung als auch verlängerte sie die Überlebensdauer weit über die Monotherapiegruppen hinaus. Die zusätzliche Behandlung gegen Angiopoietin-2 bringt somit bei einer Dosis von 5 mg/kg einen Nutzen gegenüber der alleinigen Behandlung gegen VEGF. In ähnlichen präklinischen Studien zeigte die Therapie gegen Angiopoietin-2 als Addition zur VEGF-Therapie ebenfalls eine verstärkte Wirkung (Daly et al., 2013; Hashizume et al., 2010; Koh et al., 2010). Allerdings wurden in keiner dieser Arbeiten Tumore des Gehirns untersucht. Im Gehirn wurde aber bereits eine störende Wirkung auf eine VEGFR2-Inhibition von Gliomen bei einer Überexpression von Angiopoietin-2 beschrieben (Chae et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit war das Tumorwachstum bei allen drei Behandlungsgruppen geringer als in den unbehandelten Tieren, am deutlichsten in der Gruppe, die beide Antikörper erhielt. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen waren aber zu gering, um hier einen statistisch signifikanten Vorteil der Kombination beider Antikörper zu erkennen. Interessant ist auch, dass die Tumore der länger überlebenden Tieren zunächst zwar langsamer wuchsen, letztendlich aber doch Größen von 3x3 mm bis 4x4 mm erreichten. Die behandelten Tiere verstarben aber trotz großer Tumoren nicht nach kurzer Zeit, wie es in den Kontrollgruppen auftritt. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Tumorgöße alleine nicht der entscheidende Grund für das Versterben der Kontrolltiere ist. Eine weitere, plausible Ursache ist das Auftreten von Ödemen. Ödeme sind auch in Patienten mit Gehirnmetastasen eine häufige Komplikation und führen unbehandelt schnell zum Tod. Ödeme werden in Tumoren durch eine gestörte Blut-Hirn-Schranke und die damit verbundene Penetration von Proteinen und Fluiden ins Gehirn verursacht. Im zweiten Teil dieses Experiments wurde deshalb die Permeabilität der Tumorgefäße vor der Behandlung und an Tag 6 der Behandlung verglichen. Der Austritt von 70 kDa-Dextran zeigte große Unterschiede, nicht nur von Tier zu Tier, aber auch in verschiedenen Arealen eines Tumors. Eine derart große Heterogenität wurde auch in einem Tiermodell von Gehirnmetastasen von Mammakarzinomen beschrieben (Lockman et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den unbehandelten Tieren eine Zunahme der Gefäßpermeabilität von Tag 0 zu Tag 6. Weiterhin starben die Tiere, die bereits an Tag 0 eine hohe Permeabilität aufwiesen zuerst. Dies legt den Schluss nahe, dass die hohe Gefäßpermeabilität zumindest einen wichtigen Beitrag zur frühen Sterblichkeit der unbehandelten Tiere darstellt. Die Gabe von Antikörpern gegen Angiopoietin-2 alleine konnte

keine relevante Verringerung der Permeabilität bewirken. An Tag 12 hatten die überlebenden Tiere zwar wieder niedrigere Werte als an Tag 6, allerdings können hier auch noch Einflüsse wie eine veränderte Gefäßdichte, avaskuläre Regionen oder eine schlechtere Bildqualität eine Rolle spielen. Da zu diesem Zeitpunkt keine Kontrolltiere überlebten, sollte dieses Ergebnis aber nicht überbewertet werden. Gruppen, die Antikörper gegen VEGF erhielten, zeigten an Tag 6 eine leichte Verringerung der Permeabilität gegenüber Behandlungsbeginn, vor allem aber blieben die Werte weit unter den unbehandelten Tieren. Eine Begründung für das längere Überleben könnte somit im verringertem Auftreten von Ödemen liegen, für das vor allem die Behandlung gegen VEGF verantwortlich zu sein scheint.

Weiterhin wurde für einzelne Tiere die Penetration von einem kleinen Molekül, Natrium-Fluorescein untersucht. Während die Blut-Hirn-Schranke im gesunden Gehirn Fluorescein zurückhält, tritt es im Tumor innerhalb von 90 Sekunden bereits sehr stark aus. Dies änderte sich nicht wesentlich bei der Behandlung gegen VEGF und VEGF/Angiopoietin-2 zusammen. Nur wenige Gefäße scheinen bei längerer Behandlung mit beiden Antikörpern ab Tag 12 eine geringe Durchlässigkeit zu erlangen. Allerdings sind die Stellen über den Tumor sehr heterogen verteilt. Dies legt den Schluss nahe, dass die Blut-Hirn-Schranke trotz einer reduzierten Permeabilität für das 70 kDa große Dextran immer noch durchlässig für einige kleinere Substanzen ist. Insbesondere in Hinblick auf eine gleichzeitige chemotherapeutische Behandlung könnte sich dies als günstig für eine gleichzeitige Behandlung erweisen. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf auch die Kombination einer antiangiogenen Antikörperbehandlung mit einer Chemotherapie untersucht.

Eine verringerte Penetration von 70 kDa-Dextran bedeutet aber, dass die Penetration weiterer therapeutischer Antikörper mit einer Größe von etwa 150 kDa ebenfalls von den Blutgefäßveränderungen beeinflusst werden können. Es wurde die Möglichkeit einer Messung der Penetration eines Antikörpers in einer gebräuchlichen Dosis untersucht (entsprechend 5 mg/kg Körpergewicht). Zwar ist der fluoreszenzmarkierte Antikörper in den Gefäßen deutlich sichtbar, eine Quantifizierung des Austritts wird aber durch den starken Austritt an der Oberfläche und die geringe Helligkeit erschwert und wurde deshalb nicht durchgeführt. Die Verfolgung der Lokalisation eines Antikörpers über mehrere Tage scheint jedoch möglich, da insbesondere im Tumor genug Antikörper im Gewebe austritt und vor allem auch an Tumorzellen bindet. Hier wurde ein Antikörper gegen c-Met gewählt, ein Rezeptor, der von den verwendeten Tumorzellen überexprimiert wird. Prinzipiell wäre die Untersuchung der Penetration von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Gehirnmetastasen ebenfalls von klinischer Bedeutung. Ein aktuelles Beispiel aus der Klinik ist das gehäufte Auftreten von Gehirnmetastasen bei der Antikörperbehandlung von HER2/neu-positiven Brustkrebs (z.B. Trastuzumab/Herceptin). Während der Primärtumor gut auf die Antikörper anspricht und die Patienten länger überleben, kann der Antikörper die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und trägt deshalb kaum zur Therapie von Gehirnmetastasen bei (Levitt et al., 2013). Inwiefern eine antiangiogene Therapie die Penetration von Antikörpern beeinflusst, ist deshalb ebenfalls relevant, insbesondere da in einem präklinischen Tumormodell eine reduzierte Antikörperpenetration nach Applikation von Bevacizumab beschrieben wurde (Arjaans et al., 2013). Ein intravitalmikroskopisches Experiment zur Untersuchung

der Penetration erscheint jedoch wenig sinnvoll, da aufgrund des tagelangen Verbleibs des Antikörpers im Gewebe ohnehin nur eine einmalige Applikation untersucht werden kann. Hier wäre eine Untersuchung in histologischen Schnitten sinnvoller.

Bei der Untersuchung der Blutflussgeschwindigkeiten scheint Angiopoietin-2 einen stärkeren Beitrag zur Verbesserung der Durchblutung zu leisten. Während die Werte bei der Behandlung gegen VEGF nur leicht erhöht waren, waren die Blutflussgeschwindigkeiten bei den Gruppen, die Antikörper gegen Angiopoietin-2 erhielten am höchsten. Gründe für eine verbesserte Durchblutung der Tumorgefäße können in der Normalisierung von erweiterten und verlängerten Gefäßen liegen. In den Behandlungsgruppen erscheinen die Gefäße meist deutlich glatter als in unbehandelten Tieren. Auch die Anzahl an sprossenden Blutgefäßen könnte für einen gleichmäßigeren Blutfluss sorgen. In einer ähnlichen Studie reduzierten Antikörper gegen Angiopoietin-2 und gegen VEGF die Anzahl an sprossenden Blutgefäßen (Hashizume et al., 2010). Es überrascht, dass die Blutflussgeschwindigkeit einer Therapie gegen VEGF alleine niedriger ist als bei einer Therapie gegen Angiopoietin-2 alleine. Möglicherweise ist der Behandlungseffekt bei der gewählten Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht gegen VEGF noch nicht vollständig ausgereizt. In einer vergleichbaren Studie bei Glioblastomen bewirkte eine Erhöhung der Dosis VEGF auf 25 mg/kg Körpergewicht auch eine Erhöhung der Blutflussgeschwindigkeit (von Baumgarten et al., 2011). Bei der Untersuchung des Gefäßdurchmessers zeigte sich in den Kontrollgruppen ein Anstieg von Tag 0 zu Tag 6, der auf eine große Zahl pathologisch erweiterter Gefäße zurückzuführen ist. Behandlungsgruppen mit VEGF blieben dagegen unter den Werten der unbehandelten Tiere. Ein später zu beobachtender Anstieg ist vielmehr auf das Verschwinden kleiner Blutgefäße zurückzuführen, während lediglich Gefäße mittlerer Größe verbleiben. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen gemessen werden. Bei den Gefäßvolumen zeigte sich ähnlich wie beim Durchmesser ein Rückgang für die Gruppen  $\alpha$ VEGF und  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Angiopoietin-2, aber nicht für die Kontrollgruppe und  $\alpha$ Angiopoietin-2 alleine. An dieser Stelle ist anzufügen, dass die Technik, einzelne Tumorregionen intravital über die Zeit zu verfolgen, um die Größen von Blutgefäßen zu bestimmen, experimentelle Unsicherheiten beinhaltet. Auch wenn es gelingt, exakt die gleiche Stelle über den Behandlungsverlauf zu verfolgen, was bereits experimentell sehr anspruchsvoll ist, sind die erhaltenen Aufnahmen immer noch stark durch Bildqualität, Erfolg der Fluorescein-Injektion und vor allem durch Überwachsen der Bildregion mit Tumorzellen beeinflusst. Während eine automatische Rekonstruktion von Gefäßen im Gehirn ohne Tumor hervorragend funktioniert, ist dies im Tumor mit starken Einschränkungen verbunden. Die automatische Rekonstruktion des Blutgefäßvolumens ist auch stark von der Bildqualität und damit auch von der Tiefe im Tumor abhängig.

Zusammenfassend waren durch eine antiangiogene Behandlung der Gehirnmastasen gegen VEGF und Angiopoietin-2 Vorteile in Gesamtüberlebenszeit, Tumorstadium, Gefäßpermeabilität, Blutfluss und Blutgefäßdurchmesser sichtbar.

#### 5.2.4 Kombination von antiangiogener Behandlung und Chemotherapie

Von besonderem Interesse für eine Translation in die Klinik, ist die Kombination einer antiangiogenen Behandlung mit einer Chemotherapie. Während in klinischen Studien die antiangiogene Therapie alleine nur geringe Vorteile bei der Behandlung von humanen Tumoren zeigte (Jain, 2001; Jain et al., 2006), führte eine Kombination mit Chemotherapeutika bei einigen Krebsarten (Mammakarzinom, kolorektales Karzinom, Lungenkarzinom, Nierenzellkarzinom) zu einem stärkeren Effekt der Chemotherapie und wird deshalb auch in der Klinik eingesetzt. Im vorhergehenden Experiment der vorliegenden Arbeit wurden bereits funktionelle Blutgefäßveränderungen beschrieben. Insbesondere der verbesserte Blutfluss spricht für eine verbesserte Lieferung von weiteren Wirkstoffen in den Tumor. Während die Penetration von 70 kDa-Dextranen reduziert war, konnte dies für das niedermolekulare Fluorescein nicht beobachtet werden. Die gängigste Erklärung für dieses Phänomen ist die Hypothese der vaskulären Normalisierung (Goel et al., 2011), die aufgrund der förderlichen Blutgefäßveränderungen zu einer verbesserten Wirkstoffpenetration im Tumor führt. In präklinischen Modellen ist dieser Effekt möglicherweise zeitlich begrenzt, man spricht vom Normalisierungsfenster (Lewis, 2011; Winkler et al., 2004). Es ist kontrovers, inwiefern dieser Effekt bei Tumorpatienten auftritt. Tumore des Gehirns spielen hierbei auch eine besondere Rolle, da im Gehirn insbesondere die Integrität der Blut-Hirn-Schranke eine wesentliche Rolle bei der Penetration von Wirkstoffen spielt. Weiterhin sind die Bedeutung und der Einfluss der antiangiogenen Behandlung bei Ödemen als häufige Todesursache sowohl bei Glioblastomen als auch bei Gehirnmetastasen nicht zu unterschätzen. Das rezidivierende Glioblastom ist auch eine der wenigen Tumorerkrankungen, bei denen Avastin als Monotherapie verwendet wird, zumindest in den USA. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind zwei große Phase III-Studien (AVAGLIO<sup>1</sup> und RTOG 0825<sup>2</sup>) mit Avastin und Strahlen- und Chemotherapie beim neu diagnostizierten Glioblastom abgeschlossen, aber noch nicht veröffentlicht. Das Ergebnis steht jedoch schon fest: Es konnten keine signifikante Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit durch eine Zugabe von Avastin erzielt werden. Dies deutet durchaus darauf hin, dass die Hypothese der Gefäßnormalisierung im Gehirn nicht unbedingt zutreffen muss oder die Behandlung zeitlich nicht optimal gewählt wird. In der AVAGLIO Studie ist die progressionsfreie Überlebenszeit verbessert, nicht aber in der RTOG 0825 Studie. Ein geringer Nutzen von Avastin scheint somit zumindest in einer der beiden Studien aufzutreten. Die Rolle der antiangiogenen Behandlung bei Tumoren des Gehirns ist weiterhin von aktueller Relevanz. Die Behandlung von Gehirnmetastasen mit chemotherapeutischen Agenzien ist nicht ohne weiteres mit der Verwendung solcher Wirkstoffe in anderen Tumorentitäten vergleichbar. Zum einen existiert keine, generell für Gehirnmetastasen effektive Chemotherapie, zum anderen werden auch unabhängig von den Gehirnmetastasen Wirkstoffe zur Behandlung des Primärtumors eingesetzt. In dieser Arbeit wurde zur Behandlung der Metastasen eine Vorauswahl von potentiell wirksamen, grundsätzlich verwendbaren Zytostatika getroffen.

<sup>1</sup> <http://www.oncolink.org/conferences/article1.cfm?id=2304&c=429>

<sup>2</sup> [http://www.roche.com/de/media/media\\_releases/med-cor-2013-06-01.htm](http://www.roche.com/de/media/media_releases/med-cor-2013-06-01.htm)

Vincristin<sup>3</sup> zeigte die stärkste Wirkung bei niedriger Dosis, zeigt aber bei Mäusen mit einem LD50 Wert von 3 mg/kg Körpergewicht (intraperitoneal) auch die höchste Toxizität. Deshalb wurden Etoposid<sup>4</sup> (LD50: 64 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal) und Irinotecan<sup>5</sup> (LD50: 177mg/kg, intraperitoneal) für den Versuch ausgewählt. Da in Vorversuchen bei jeweils zwei Tieren keine Verlängerung der Überlebenszeit bei 25 mg/kg Körpergewicht beobachtet werden konnte, wurde der Versuch mit einer relativ hohen Dosis von jeweils 50 mg/kg an Tag 16 und 22 durchgeführt. Eine Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht Irinotecan pro Woche nimmt in präklinischen Studien einen eher hohen Wert ein (5 mg/kg entspricht etwa einer niedrigen Dosis, 25 mg/kg einer mittleren Dosis), wird in Kombination mit antiangiogenen Behandlungen ähnlicher Studien (H. Huang et al., 2011) aber durchaus verwendet. Die Verwendung einer niedrigen Dosis wäre zur Vermeidung von Nebenwirkungen wünschenswert. Allerdings wäre der Versuch obsolet, wenn durch die Chemotherapie keine Wirkung erzielt wird. Deshalb wurde die Dosis der Chemotherapie in diesem Versuch hoch angesetzt.

In diesem Versuch wurde die antiangiogene Behandlung bereits an Tag 14 begonnen, damit etwas früher als im Experiment zuvor. Bei der Betrachtung der Überlebensdauer ist erneut eine starke Verlängerung der Überlebensdauer der mit  $\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2 behandelten Tiere im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe zu erkennen. Die Chemotherapie alleine zeigte eine Verlängerung der Überlebensdauer, allerdings weitaus geringer als die alleinige antiangiogene Behandlung. Die Kombination von antiangiogener Therapie und Chemotherapie zeigte überraschenderweise keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit und blieb unter den einzelnen Behandlungen. Es ist somit möglich, dass die antiangiogene Behandlung die Wirkung der Chemotherapie einschränkt. Ein möglicher Mechanismus wäre z.B. eine geringere Penetration der Chemotherapie im Tumorgewebe, aufgrund der Gefäßnormalisierung entsprechend der Hypothese der vaskulären Normalisierung. Für die relativ kurzen Überlebenszeiten war sicherlich auch eine mögliche Toxizität verantwortlich, insbesondere durch die wiederholten Applikationen der verschiedenen Substanzen (Irinotecan, Etoposid, Acridinorange und die zwei antiangiogenen Antikörper). Dennoch tritt dieser Effekt nur in dieser Gruppe auf, nicht aber in den Monotherapiegruppen. Ein direkter Vergleich zu ähnlichen Experimenten ist nicht ohne weiteres möglich. In klinischen Studien ist der Effekt einer Chemotherapie weit größer als der einer antiangiogenen Behandlung. Erst in der gleichzeitigen Anwendung ist die Wirkung in einigen Fällen verstärkt. In der vorliegenden Arbeit ist der Effekt der antiangiogenen Behandlung alleine bereits viel stärker als die Chemotherapie alleine, während zusammen kein Vorteil mehr erkennbar ist. Dazu ist zu ergänzen, dass in präklinischen Modellen häufig große Effekte einer antiangiogenen Monotherapie beschrieben wurden, diese sich jedoch nie direkt auf die Klinik haben übertragen lassen.

Bei der Betrachtung der Tumorgrößen konnten in allen Behandlungsgruppen etwas flachere Kurvenverläufe beobachtet werden. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle zeigten die beiden Gruppen mit antiangiogener Behandlung bzw. antiangiogener Behandlung mit Chemotherapie, nicht aber die Chemotherapie allein. Allerdings war der Effekt bei der Kombination von Chemotherapie und antiangiogener Behandlung am stärksten. Hierzu ist zu ergänzen, dass in

<sup>3</sup> <http://bdipharma.com/MSDS/Hospira/VincristineSulfateInjection.pdf>

<sup>4</sup> <http://www.lookchem.com/Etoposide/>

<sup>5</sup> [http://bdipharma.com/MSDS/Teva/Irinotecan\\_MSDS.pdf](http://bdipharma.com/MSDS/Teva/Irinotecan_MSDS.pdf)



diesem Experiment die Streuung der Tumorgrößen etwas größer ist als zuvor, da generell ab Tag 14 behandelt wurde, unabhängig von der Tumorgröße. Deshalb konnte eine statistisch aussagekräftige Unterscheidung der drei Behandlungsgruppen auch nicht erreicht werden. Die Messung der Überlebenszeiten ist deshalb auch in diesem Versuchsteil sicherlich aussagekräftiger. Ähnliche Kurvenverläufe mit dem stärksten Tumorwachstum bei unbehandelten Tieren und dem geringsten Tumorwachstum bei der Kombination von Chemotherapie und antiangiogener Behandlung gegen Angiopoietin-2 wurden bereits beschrieben (H. Huang et al., 2011). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die gemeinsame Anwendung von Chemotherapie und antiangiogener Therapie zumindest eine verbesserte Wirkung auf das Tumorwachstum hat. Es gilt zu klären, ob eine Intervallbehandlung vor, während oder nach einer Chemotherapie die günstigsten Resultate in Patienten bewirkt.

Weiterhin wurde versucht, die Effekte der Chemotherapie auf zellulärer Ebene zu vergleichen. Dazu wurde eine Markierung mit Acridinorange verwendet. Acridinorange bindet an Nucleinsäuren, dringt allerdings nur in den Kern vor, wenn die Zelle bereits beeinträchtigt ist. Acridinorange wurde bereits zur Detektion von apoptotischen Neuronen im Zebrafisch eingesetzt (Paquet et al., 2009), durchdringt aber im Mäusehirn nicht die Blut-Hirn-Schranke. Die in dieser Arbeit erstellten Aufnahmen lassen jedoch keinen Zweifel daran, dass im Tumorbereich die Blutgefäße durchlässig für Acridinorange sind. Im Zeitverlauf der Versuche konnte für die Kontrollgruppen ein Abfall an markierten Zellen beobachtet werden. Die Gruppen der antiangiogenen Behandlung (mit und ohne Chemotherapie) folgten in den ersten 20 Tagen mehr oder weniger diesem Abfall. Die Chemotherapie allein dagegen zeigt 24 h nach der Applikation einen leichten Anstieg, der möglicherweise auf eine erhöhte Zahl von toten oder sterbenden Zellen hindeutet. Leider ist die Varianz in diesem Versuchsteil viel zu hoch, um mehr als eine Tendenz zu beschreiben. Bei den beobachteten Unterschieden und Standardabweichungen wäre eine Gruppengröße von mindestens 10 Tieren notwendig, um diese Frage statistisch abzusichern. Intravitalmikroskopisch erscheint dies jedoch experimentell zu aufwändig. Die Beantwortung der Fragestellung (erhöhter Zelltod kurz nach der Applikation der Chemotherapie) in histologischen Schnitten mit einer konventionellen Zelltotfärbung wäre in diesem Fall sicherlich sinnvoller. Dennoch deutet dieses Experiment zumindest eine Tendenz an. Demnach ist ein Anstieg der sterbenden Zellen kurz nach der Applikation der Chemotherapie bei gleichzeitiger antiangiogener Therapie geringer als ohne die antiangiogene Behandlung.

Die Verwendung von Acridinorange zur Markierung von Tumorzellen ist bereits seit langem bekannt (Wittekind, 1958), wurde jedoch bisher nicht zur chronischen Intravitalmikroskopie eingesetzt. Markiert die Färbung verlässlich kompromittierte Zellen, bietet sie eine günstige und leicht anzuwendende Methode, Wirkung und Resistenzmechanismen von antitumoralen Behandlungen chronisch zu untersuchen. Die große Varianz im Tumormodell von Gehirnmetastasen erschwert jedoch die Durchführung derartiger Studien. Ein ähnlicher Versuch mit einer Bestrahlungstherapie wäre ein geeigneter Ansatz, um dem nachzugehen.

### **5.2.5 Intravitalmikroskopie von Mikroglia und Makrophagen während des Wachstums von Gehirnetastasen und antiangiogener Behandlung**

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit existieren keine Veröffentlichungen intravitalmikroskopischer Untersuchungen von Mikroglia/Makrophagen in Tumormodellen im Gehirn. Die Untersuchung von Mikroglia im Tumor erfordert höchste Ansprüche an die Bildqualität und ist deshalb sicherlich der experimentell anspruchsvollste Teil dieser Arbeit. Dennoch bietet die Intravitalmikroskopie in diesem Gebiet eine große Chance, bisher nicht beschriebene dynamische Ereignisse zu entdecken. Gerade die Dynamik von Mikroglia und Makrophagen macht die Intravitalmikroskopie experimentell besonders wertvoll. Die in dieser Arbeit aufgenommen Zeitserien von 30 Minuten liefern bereits einen ersten Eindruck über die Möglichkeiten dieser Technik. Die hier verkreuzte immundefiziente Mauslinie mit GFP-positiven Mikroglia ist ein nützliches Instrument für die Forschung in diesem Bereich. Einerseits sind Arbeiten mit den weitaus häufiger verwendeten humanen Tumorzelllinien möglich. Weiterhin ist es mit dieser Mauslinie leichter, qualitativ gute Aufnahmen zu erzielen. In immunkompetenten Tieren ist die Bildqualität durch stärkere Entzündungsreaktionen in Tumoren in der Regel ungünstiger. Fraglich ist jedoch, inwiefern die immundefizienten Tiere das Immunmilieu eines humanen Tumors im menschlichen Gehirn widerspiegeln. Die hier erstellten Aufnahmen lassen jedoch wenig Zweifel, dass zumindest die starke Akkumulation und Aktivierung der Mikroglia und Makrophagen auch in immundefizienten Tieren stattfindet.

Gerade die gleichzeitige Darstellung von Blutgefäßen, Mikroglia und Tumorzellen ist äußerst attraktiv für eine Vielzahl von Untersuchungen der Angiogenese und bei Entzündungsmechanismen in Tumoren. Ein wesentliches Hindernis zur Blutgefäßdarstellung sind derzeit jedoch die Kosten von nah-infraroten Blutgefäßfarbstoffen. Evans Blue eignet sich nur eingeschränkt zu wiederholten Aufnahmen, da es im Gewebe verbleibt. Kostspielige Alternativen sind derzeit Angiosense-680 oder Dextran-gekoppelte nah-infrarote Alexa-Farbstoffe. Leider liegen die Kosten für diese Substanzen derzeit bei über 100 Euro pro Injektion. Dies schränkt die Verwendung solcher Marker stark ein.

In dieser Versuchsreihe konnte ein Rückgang der Mikroglia-dichte im Zeitverlauf beobachtet werden. Zunächst stellt sich die Frage, inwiefern die operativen Eingriffe die Anzahl und Aktivierung von Mikroglia beeinflussen. Es ist bekannt, dass die Operation des kraniellen Fensters in den ersten Tagen (und auch bis zu 3 Wochen) eine starke gliale Aktivierung verursacht (Xu et al., 2007). Deshalb wurde in diesem Versuch mindestens 4 Wochen nach der Operation abgewartet, um diese Entzündungsperiode zu umgehen. Zur Injektion der Tumorzellen muss das kranielle Fenster erneut geöffnet werden und das Gehirn wird durch eine Nadel verletzt. Das Wiederöffnen des Fensters scheint keine wesentlichen längeren Entzündungsreaktion zu verursachen, da die Mikroglia außerhalb des Tumors an Tag 7 in Form, Dichte und Abtastverhalten normal erscheinen. Mikroglia werden durch eine Vielzahl von Manipulationen und Schäden aktiviert. Gängige Techniken umfassen das Setzen eines Gefäßschadens durch den Zweiphotonenlaser, mechanische Schäden, Injektionen von Lipopolysacchariden oder auch den Austritt von Fibrinogen aus Blutgefäßen bei Beeinträchtigung der Bluthirnschranke (Davalos

et al., 2012). Der Schaden, der durch den Einstich der Nadel verursacht wird ist, verursacht sicherlich zu einem beträchtlichen Anteil eine Aktivierung der Mikroglia in den ersten Tagen, was teilweise noch die hohe Mikrogliazahlen an Tag 7 erklären kann. Jedoch ist generell in den ersten zwei Wochen eine hohe Mikrogliaichte im gesamten Tumor zu beobachten, insbesondere auch am neu entstandenen Randbereich. Da bei einem Tumor von 1 mm Durchmesser ein Einstichbereich von etwa 300 µm nur etwa 10% der Fläche beträgt, ist der Großteil der Mikroglia durch den wachsenden Tumor aktiviert. Auffällig ist auch der geringe Einfluss auf Mikroglia außerhalb des Tumors. Alle Mikroglia tasten weiterhin die Umgebung ab und nehmen keine aktivierte, amöboide Form an. Gehirnmetastasen bilden in der Regel auch in Patienten eine klare Grenze, anders als diffus und infiltrativ wachsende Glioblastome, für die auch im Randbereich eine starke Mikrogliaaktivierung beschrieben ist (Gabrusiewicz et al., 2011).

Eine wesentliche Fragestellung war, ob die antiangiogene Behandlung Mikrogliaichte, Lokalisation oder Aktivierung verändert. Insbesondere für die Inhibition von Angiopoietin-2 wurde eine Verringerung der Anzahl von TIE2-positiven Makrophagen in verschiedenen Tumormodellen beschrieben. Für ein Mausmodell mit einer subkutanen Kolonkarzinomzelllinie ist eine Reduzierung der TIE2-positiven Makrophagen beschrieben (H. Huang et al., 2011). In einem Mausmodell eines Mammakarzinoms wurde nach Angiopoietin-2-Inhibition keine Veränderung der Anzahl von Makrophagen im Tumor gefunden, allerdings sind in der Behandlungsgruppe weitaus weniger Mikroglia mit Blutgefäßen assoziiert als ohne Behandlung (Mazzieri et al., 2011). Nicht alle Veröffentlichungen mit Angiopoietin-2 Inhibitoren untersuchen den Einfluss auf Makrophagen (Koh et al., 2010; Thomas et al., 2013). Es existieren bisher keine Untersuchungen über den Verlauf der Mikrogliaichte in Mausmodell von Gehirntumoren während einer antiangiogenen Therapie. Ein Einfluss spezifisch nur für TIE2-positive Makrophagen kann in dem Modell der vorliegenden Arbeit intravital nicht untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde deshalb die Mikrogliaichte im Zeitverlauf gemessen. Die beobachtete durchschnittliche Mikrogliaichte im Tumor nahm im Laufe der Versuchsdauer ab. Es sollte jedoch nicht der Eindruck entstehen, dass es über den gesamten Tumor eine gleichmäßige Verringerung der Anzahl an Mikroglia stattfindet. Vielmehr bilden sich lokal deutliche erkennbare Stellen einer Größe von wenigen hundert µm heraus, bei denen deutlich weniger Mikroglia vorhanden sind. Dies tritt auch schon an Tag 14, vor dem Einfluss einer antiangiogenen Behandlung auf. An Tag 6 der antiangiogenen Therapie sind noch keine Unterschiede zwischen den mittleren Mikrogliaichten der Gruppen messbar. An Tag 12 war die Mikrogliaichte in der Behandlungsgruppe reduziert, der Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz. Die statistische Behandlung wird hierbei durch die starke Varianz zwischen den einzelnen Tieren erschwert. Ebenfalls ungünstig für einen statistischen Vergleich ist die hohe Sterblichkeit der Kontrolltiere, da an Behandlungstag 12 in der Regel mehr als 50% der unbehandelten Tiere bereits verstorben sind. Ein wesentlicher Grund für das Auftreten einer geringeren Mikrogliaichte, ist die Entstehung von lokalen, avaskulären, wahrscheinlich nekrotischen Bereichen ohne Tumorzellen. Die Bereiche mit Blutgefäßen zeigen dagegen eine niedrige Mikrogliaichte auf. Interessanterweise sind diese Regionen auch schon an früheren Zeitpunkten durch die geringe Mikrogliaichte erkennbar. Die unterschiedliche Mikrogliaichte in diesem Modell scheint also nicht direkt durch

---

eine Reduktion der Mikroglia zu erfolgen, sondern vielmehr durch eine Selektion von Regionen geringer Mikroglia-dichte. Dieses Phänomen konnte nur durch wiederholte Intravitalaufnahmen entdeckt werden. Ein klassisches Experiment mit histologischen Schnitten hätte möglicherweise zum Schluss geführt, dass die antiangiogene Behandlung direkt die niedrigere Mikroglia-dichte verursacht hat. Auf eine Bewertung der Gefäßlokalisierung der Makrophagen wurde hier verzichtet. Während im gesunden Gehirn ein beträchtlicher Anteil der Mikroglia direkt an einem Gefäß anhaftet, fällt eine derartige Einteilung im Tumor schwer. Durch die extrem hohe Anzahl von Mikroglia/Makrophagen im Tumor sind die meisten Makrophagen mit Tumorzellen assoziiert.

### 5.2.6 Zusammenfassung, klinische Relevanz und Ausblick

Im diesem Projekt wurde die Wirkung von antiangiogenen Antikörpern gegen VEGF und Angiopoietin-2 auf etablierte Gehirnmastasen untersucht. In allen Experimenten überlebten dabei die Tiere, die beide Behandlungen erhalten hatten, deutlich länger als unbehandelte Tiere. Die Kombination der Antikörper war dabei weitaus effektiver als die Behandlung mit VEGF allein. Bei der Untersuchung wurden einzelne dynamische Parameter vor allem durch die Antikörper gegen VEGF beeinflusst. So traten eine geringere Permeabilität und ein geringeres Gefäßvolumen vor allem bei den Gruppen auf, die anti-VEGF erhielten. Vor allem die reduzierte Permeabilität steht in Korrelation mit der verringerten Sterblichkeit der Tiere, ursächlich wahrscheinlich durch ein geringeres Auftreten von Ödemen. Aber auch die Behandlung mit dem anti-Angiopoietin-2-Antikörper zeigte zumindest eine verbesserte Tendenz bei Parametern wie dem Tumorstachstum, dem Gefäßdurchmesser und auch einen signifikanten Beitrag zur Verbesserung der Blutflussgeschwindigkeit. Aus der Gesamtheit der durchgeführten Versuche lässt sich schlussfolgern, dass eine erfolgreiche antiangiogene Therapie gegen VEGF und Angiopoietin-2 eine lebensverlängernde Wirkung auf die Versuchstiere zeigte. Die Addition von Angiopoietin-2 verstärkte den Effekt gegenüber einer VEGF Monotherapie. Während es positive Effekte der Angiopoietin-2-Inhibition gibt, sind diese nicht stark genug, um eine alleinige Anwendung von anti-Angiopoietin-2 vorzuziehen. Es erscheint somit sinnvoll, statt einer hohen Dosis von anti-VEGF eine niedrige Dosis von anti-VEGF gemeinsam mit anti-Angiopoietin-2 einzusetzen.

Aufgrund dieser Daten erscheint eine klinische Studie mit antiangiogenen Inhibitoren nicht nur zur Prävention der Entstehung von Gehirnmastasen, sondern auch zur begleitenden Therapie von bereits bestehenden Gehirnmastasen sinnvoll. Es bleibt zu klären, inwiefern sich die Vorteile der Behandlung vom Mausmodell auch auf Patienten übertragen lassen. In vielen anderen Krebsarten brachte die antiangiogene Therapie alleine nur relativ geringe Vorteile für die Gesamtüberlebenszeit. Zumindest besteht die Hoffnung durch eine Reduzierung von Ödemen durch die antiangiogene Behandlung eine häufige Todesursache bei Gehirnmastasen zu adressieren. Inwiefern diese Effekte auch über eine längere Behandlungsdauer in Patienten bestehen, kann nur in einer klinischen Studie beantwortet werden. Bei Tumorstadien scheint die antiangiogene Behandlung in vielen Fällen nur transiente Effekte zu bewirken. Welche Mechanismen nach einiger Zeit zur Resistenz führen könnten, ist Thema aktueller Forschung (Carmeliet & Jain, 2011). Eine Phase II Studie mit Avastin bei Patienten mit Lungenkrebs und bestehenden Gehirnmastasen (ML21823-Roche) ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit abgeschlossen, die Ergebnisse aber noch nicht publiziert.

Weiterhin wurde die antiangiogene Therapie mit einer Chemotherapie kombiniert und verglichen. Nach Identifizierung wirksamer Zytostatika konnte für Irinotecan/Etoposid zumindest in hoher Dosis eine leichte Verbesserung der Überlebenszeit beobachtet werden. Weitaus länger lebten jedoch die Tiere, die nur die antiangiogene Behandlung erhielten. In Patienten mit Gehirnmastasen ist die Wirksamkeit von Chemotherapeutika meist so gering, dass diese Behandlung in der Regel nicht zur Anwendung kommt. Interessanterweise war die



gemeinsame antiangiogene Behandlung und Chemotherapie weitaus weniger erfolgreich als erwartet. Während das Tumorwachstum zwar am stärksten eingeschränkt war, lebten die Tiere nicht wesentlich länger als die Kontrolltiere. Demnach ist die Kombination von Chemotherapie nach antiangiogener Behandlung bei Gehirnmastasen nicht förderlich. Inwiefern Nebeneffekte der Chemotherapie hier eine Rolle spielen konnte nicht weiter untersucht werden.

Schließlich wurde die Rolle der Mikroglia und Makrophagen bei der antiangiogenen Behandlung untersucht. Es konnte kein Einfluss der antiangiogenen Behandlung auf die Mikroglia-dichte gefunden werden. Interessanterweise schien die Mikroglia-dichte aber einen Einfluss auf die Veränderungen der Blutgefäße zur Normalisierung oder Regression zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass bei großen Tumoren in Regionen niedriger Mikroglia/Makrophagendichte die Blutgefäße erhalten bleiben, während sie in Regionen hoher Mikroglia-dichte untergehen. Eine weitere Untersuchung der Rolle von Mikroglia in diesem Zusammenhang erscheint sinnvoll. Inwiefern man die Rolle der Makrophagen bei der antiangiogenen Therapie therapeutisch ausnutzen kann, ist Thema aktueller Forschung (Squadraro & De Palma, 2011). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit sind die Mechanismen jedoch noch zu unklar um eine mögliche Anwendung abzusehen. Erst kürzlich wurde in humanen Glioblastompatienten ein Anstieg der Dichte an TAMs nach einer antiangiogenen Therapie beschrieben (Lu-Emerson et al., 2013). Eine erhöhte Makrophagendichte korrelierte hier mit einem geringeren Überleben. In diesem Zusammenhang wird auch aktuell diskutiert, inwiefern Makrophagen zur Resistenz gegen antiangiogene Behandlungen beitragen. Die hier gekreuzte immundefiziente Mauslinie zur Untersuchung von Mikroglia in humanen Tumoren könnte sich als äußerst nützlich für weitere Studien in dieser Richtung erweisen.



## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
+	Wildtyp Allel
$\alpha$ VEGF/ $\alpha$ Ang2	Antikörper gegen VEGF/Angiopoietin-2
2P-LSM	Zweiphotonen Laser Scanning Mikroskopie
5-ALA	5-Aminolävulinssäure
Ang	Angiopoietin
BSA	bovines Serumalbumin
CT	Computertomographie
CX <sub>3</sub> CR1	Fraktalkin-Rezeptor 1
Dll4	Delta like ligand 4
DMEM	englisch: Dulbecco's modified eagle medium:
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRed2	<i>Discosoma</i> sp. Red2: rot fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	englisch: Enhanced green fluorescent protein
EGFR	englisch: epidermal growth factor receptor
FBS	englisch: Fetal bovine serum, fötales Kälberserum
FGF	englisch: Fibroblast growth factor: Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FOXN1	englisch: Forkhead box protein N1
GaAsP	Galliumarsenid Phosphit
G418	Geneticin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIF	englisch.:Hypoxia-inducible factor
ICG	Indocyaningrün
i.p.	intraperitoneal
IR	infrarot
i.v	intravenös
kDa	Kilodalton
LD50	Letale Dosis für 50% der Versuche
LOH	engl.: loss of heterozygosity
MDa	Megadalton
mg/kg KG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
mM	Millimolar
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MRT	Magnetresonanztomographie
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
NDD	englisch: non-descanned detector
NMRI	Naval Medical Research Institute
PBS	englisch: phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Saline
PCR	englisch.: polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHD	Prolyl Hydroxylase Domäne

PpIX	Protoporphyrin IX
PTEN	englisch.: phosphatase and tensin homolog
TAM	Tumor-assozierter Makrophage
TEM	TIE2-exprimierender Makrophage
TIE (TIE1, TIE2)	englisch.: Tyrosin kinase with Ig and EGF homology domains
UV	Ultraviolett
VEGF	englisch.: vascular endothelial growth factor
VEGFR	englisch.: vascular endothelial growth factor receptor
WHO	englisch.: World Health Organisation: Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*, 339(6116), 156–161. doi:10.1126/science.1227901
- Arjaans, M., Oude Munnink, T. H., Oosting, S. F., Terwisscha van Scheltinga, A. G. T., Gietema, J. A., Garbacik, E. T., ... de Vries, E. G. E. (2013). Bevacizumab-Induced Normalization of Blood Vessels in Tumors Hampers Antibody Uptake. *Cancer research*, 73(11), 3347–3355. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3518
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., ... Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, 468(7323), 557–561. doi:10.1038/nature09522
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., & Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(3), 165–177. doi:10.1038/nrm2639
- Bagri, A., Kouros-Mehr, H., Leong, K. G., & Plowman, G. D. (2010). Use of anti-VEGF adjuvant therapy in cancer: challenges and rationale. *Trends in molecular medicine*, 16(3), 122–32. doi:10.1016/j.molmed.2010.01.004
- Barnholtz-Sloan, J. S., Sloan, A. E., Davis, F. G., Vigneau, F. D., Lai, P., & Sawaya, R. E. (2004). Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *Journal of clinical oncology*, 22(14), 2865–2872. doi:10.1200/JCO.2004.12.149
- Barretto, R. P. J., Ko, T. H., Jung, J. C., Wang, T. J., Capps, G., Waters, A. C., ... Schnitzer, M. J. (2011). Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy. *Nature medicine*, 17(2), 223–228. doi:10.1038/nm.2292
- Belluscio, L. (2005). Two-photon imaging in live rodents. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 2, Unit 2.9. doi:10.1002/0471142301.ns0209s32
- Bestvater, F., Spiess, E., Stobrawa, G., Hacker, M., Feurer, T., Porwol, T., ... Acker, H. (2002). Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging. *Journal of Microscopy*, 208(2), 108–115. doi:10.1046/j.1365-2818.2002.01074.x
- Burger, R. a, Brady, M. F., Bookman, M. a, Fleming, G. F., Monk, B. J., Huang, H., ... Liang, S. X. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine*, 365(26), 2473–2483. doi:10.1056/NEJMoa1104390
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298–307. doi:10.1038/nature10144



- Cascone, T., & Heymach, J. V. (2012). Targeting the angiopoietin/Tie2 pathway: cutting tumor vessels with a double-edged sword? *Journal of clinical oncology*, 30(4), 441–444. doi:10.1200/JCO.2011.38.7621
- Chae, S.-S., Kamoun, W. S., Farrar, C. T., Kirkpatrick, N. D., Niemeyer, E., de Graaf, A. M. a, ... Fukumura, D. (2010). Angiopoietin-2 interferes with anti-VEGFR2-induced vessel normalization and survival benefit in mice bearing gliomas. *Clinical cancer research*, 16(14), 3618–3627. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3073
- Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., & Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 59(8), 1169–1180. doi:10.1002/glia.21136
- Daly, C., Eichten, A., Castanaro, C., Pasnikowski, E., Adler, A., Lalani, A. S., ... Thurston, G. (2013). Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer research*, 73(1), 108–118. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2064
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. a, & Barres, B. a. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566. doi:10.1038/nature09513
- Davalos, D., Ryu, J. K., Merlini, M., Baeten, K. M., Le Moan, N., Petersen, M. a, ... Akassoglou, K. (2012). Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nature communications*, 3, 1227. doi:10.1038/ncomms2230
- De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L. S., Sampaolesi, M., & Naldini, L. (2005). Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer cell*, 8(3), 211–226. doi:10.1016/j.ccr.2005.08.002
- Denk, W., Strickler, J., & Webb, W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76. doi:10.1126/science.2321027
- Dolecek, T. a, Propp, J. M., Stroup, N. E., & Kruchko, C. (2012). CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro-oncology*, 14 Suppl 5, v1–49. doi:10.1093/neuonc/nos218
- Drew, P. J., Shih, A. Y., Driscoll, J. D., Knutsen, P. M., Blinder, P., Davalos, D., ... Kleinfeld, D. (2010). Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nature methods*, 7(12), 981–984. doi:10.1038/nmeth.1530
- Drobizhev, M., Makarov, N. S., Tillo, S. E., Hughes, T. E., & Rebane, A. (2011). Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5), 393–399. doi:10.1038/nmeth.1596

- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 617–625. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.010
- Ellis, L., & Hicklin, D. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews. Cancer*, 8(8), 579–91. doi:10.1038/nrc2403
- Ellis, T. L., Neal, M. T., & Chan, M. D. (2012). The role of surgery, radiosurgery and whole brain radiation therapy in the management of patients with metastatic brain tumors. *International journal of surgical oncology*, 2012, Article ID 952345. (ohne Seitenzahlen) doi:10.1155/2012/952345
- Ennis, S. ., Novotny, A., Xiang, J., Shakui, P., Masada, T., Stummer, W., ... Keep, R. . (2003). Transport of 5-aminolevulinic acid between blood and brain. *Brain Research*, 959(2), 226–234. doi:10.1016/S0006-8993(02)03749-6
- Fagerholm, U. (2007). The highly permeable blood-brain barrier: an evaluation of current opinions about brain uptake capacity. *Drug discovery today*, 12(23-24), 1076–1082. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.005
- Fagiani, E., & Christofori, G. (2013). Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters*, 328(1), 18–26. doi:10.1016/j.canlet.2012.08.018
- Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., ... Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 116(5), 829–840. doi:10.1182/blood-2009-12-257832
- Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., ... Augustin, H. G. (2012). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *The Journal of clinical investigation*, 122(6), 1991–2005. doi:10.1172/JCI58832
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., ... Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573), 439–442. doi:10.1038/380439a0
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285(21), 1182–1186. doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Fomchenko, E. I., & Holland, E. C. (2006). Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials. *Clinical cancer research*, 12(18), 5288–5297. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0438
- Gabrusiewicz, K., Ellert-Miklaszewska, A., Lipko, M., Sielska, M., Frankowska, M., & Kaminska, B. (2011). Characteristics of the alternative phenotype of microglia/macrophages and its modulation in experimental gliomas. (P. Rameshwar, Ed.) *PloS one*, 6(8), e23902. doi:10.1371/journal.pone.0023902

- Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., ... Jackson, D. (2002). Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1. *Developmental Cell*, 3(3), 411–423. doi:10.1016/S1534-5807(02)00217-4
- Gerald, D., Chintharlapalli, S., Augustin, H. G., & Benjamin, L. E. (2013). Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer research*, 73(6), 1649–1657. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4697
- Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiological reviews*, 91(3), 1071–1121. doi:10.1152/physrev.00038.2010
- Hashizume, H., Falcón, B. L., Kuroda, T., Baluk, P., Coxon, A., Yu, D., ... McDonald, D. M. (2010). Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. *Cancer research*, 70(6), 2213–23. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1977
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., ... Stupp, R. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 997–1003. doi:10.1056/NEJMoa043331
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods*, 2(12), 932–940. doi:10.1038/nmeth818
- Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D. K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S. B., ... Wilbrecht, L. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nature protocols*, 4(8), 1128–44. doi:10.1038/nprot.2009.89
- Hu, B., & Cheng, S.-Y. (2009). Angiopoietin-2: Development of inhibitors for cancer therapy. *Current Oncology Reports*, 11(2), 111–116. doi:10.1007/s11912-009-0017-3
- Huang, H., Lai, J.-Y., Do, J., Liu, D., Li, L., Del Rosario, J., ... Bhat, A. (2011a). Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clinical cancer research*, 17(5), 1001–11. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2317
- Huang, Y., Snuderl, M., & Jain, R. K. (2011b). Polarization of tumor-associated macrophages: a novel strategy for vascular normalization and antitumor immunity. *Cancer cell*, 19(1), 1–2. doi:10.1016/j.ccr.2011.01.005
- Hurwitz, H., & Fehrenbacher, L. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England journal ...*, 350(23), 2335–2342. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa032691>

- Huse, J. T., & Holland, E. C. (2009). Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 19(1), 132–43. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00234.x
- Jain, R K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine*, 7(9), 987–989. doi:10.1038/nm0901-987
- Jain, R. K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5706), 58–62. doi:10.1126/science.1104819
- Jain, R. K., Duda, D. G., Clark, J. W., & Loeffler, J. S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature clinical practice. Oncology*, 3(1), 24–40. doi:10.1038/ncponc0403
- Jain, Rakesh K, & Carmeliet, P. (2012). SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell*, 149(6), 1408–1408.e1. doi:10.1016/j.cell.2012.05.025
- James, M. L., & Gambhir, S. S. (2012). A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiological reviews*, 92(2), 897–965. doi:10.1152/physrev.00049.2010
- Johansson, A., Palte, G., Schnell, O., Tonn, J.-C., Herms, J., & Stepp, H. (2010). 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in tissue of human malignant brain tumors. *Photochemistry and photobiology*, 86(6), 1373–8. doi:10.1111/j.1751-1097.2010.00799.x
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., & Littman, D. R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology*, 20(11), 4106–14. doi:10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell*, 30(4), 393–402. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kauppinen, R. A., & Peet, A. C. (2011). Using magnetic resonance imaging and spectroscopy in cancer diagnostics and monitoring: preclinical and clinical approaches. *Cancer biology & therapy*, 12(8), 665–79. doi:10.4161/cbt.12.8.18137
- Keereweer, S., Van Driel, P. B. A. A., Snoeks, T. J., Kerrebijn, J. D. F., Baatenburg de Jong, R. J., Vahrmeijer, A. L., ... Lowik, C. W. G. M. (2013). Optical Image-Guided Cancer Surgery: Challenges and Limitations. *Clinical cancer research*, 19(14), 3745–3754. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3598
- Kettenmann, H., Hanisch, U., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia, 461–553. doi:10.1152/physrev.00011.2010.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.023

- Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E. F., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature medicine*, 16(1), 116–122. doi:10.1038/nm.2072
- Kienast, Y., & Winkler, F. (2010). Therapy and prophylaxis of brain metastases. *Expert review of anticancer therapy*, 10(11), 1763–1777. doi:10.1586/era.10.165
- Kienast, Y., Klein, C., Scheuer, W., Raemsch, R., Lorenzon, E., Bernicke, D., Herting, F., Yu, S., The, H., Martarello, L., Gassner, C., Stubenrauch, K., Munro, K., , Augustin, H., Thomas, M. (2013). *Clinical cancer research*, ahead of print (noch keine Seitenzahlen) doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0081
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362(6423), 841–844. doi:10.1038/362841a0
- Koh, Y. J., Kim, H.-Z., Hwang, S.-I., Lee, J. E., Oh, N., Jung, K., ... Koh, G. Y. (2010). Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage. *Cancer cell*, 18(2), 171–184. doi:10.1016/j.ccr.2010.07.001
- Levitt, M. R., Levitt, R., & Silbergeld, D. L. (2013). Controversies in the management of brain metastases. *Surgical neurology international*, 4(Suppl 4), S231–5. doi:10.4103/2152-7806.111300
- Lewis, M. R. (2011). Looking Through the Vascular Normalization Window: Timing Antiangiogenic Treatment and Chemotherapy with 99mTc-Annexin A5. *Journal of nuclear medicine*, 52(11), 1670–2. doi:10.2967/jnumed.111.097725
- Li, W., & Graeber, M. B. (2012). The molecular profile of microglia under the influence of glioma. *Neuro-oncology*, 14(8), 958–978. doi:10.1093/neuonc/nos116
- Lockman, P. R., Mittapalli, R. K., Taskar, K. S., Rudraraju, V., Gril, B., Bohn, K. A., ... Smith, Q. R. (2010). Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clinical cancer research*, 16(23), 5664–5678. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1564
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., ... Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2), 97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Lu-Emerson, C., Snuderl, M., Kirkpatrick, N. D., Goveia, J., Davidson, C., Huang, Y., ... Jain, R. K. (2013). Increase in tumor-associated macrophages after antiangiogenic therapy is associated with poor survival among patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncology*, 15(8), 1079–87. doi:10.1093/neuonc/not082



- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., ... Rafii, S. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature medicine*, 7(11), 1194–1201. doi:10.1038/nm1101-1194
- Ma, J., Liu, L., Che, G., Yu, N., Dai, F., & You, Z. (2010). The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC cancer*, 10(1), (112). doi:10.1186/1471-2407-10-112
- Madden, K. S., Zettel, M. L., Majewska, A. K., & Brown, E. B. (2013). Brain tumor imaging: imaging brain metastasis using a brain-metastasizing breast adenocarcinoma. *Cold Spring Harbor protocols*, 2013(3). doi:10.1101/pdb.prot073676
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., ... Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology*, 155(3), 739–752. doi:10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Mazzieri, R., Pucci, F., Moi, D., Zonari, E., Ranghetti, A., Berti, A., ... De Palma, M. (2011). Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer cell*, 19(4), 512–526. doi:10.1016/j.ccr.2011.02.005
- Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E. a., ... Davidson, N. E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*, 357(26), 2666–2676. doi:10.1056/NEJMoa072113
- Murari, K., Zhang, Y., Li, S., Chen, Y., Li, M.-J., & Li, X. (2011). Compensation-free, all-fiber-optic, two-photon endomicroscopy at 1.55  $\mu\text{m}$ . *Optics letters*, 36(7), 1299–1301. doi:10.1364/OL.36.001299.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1314–1318. doi:10.1126/science.1110647
- Norden, A. D., Drappatz, J., & Wen, P. Y. (2009). Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nature reviews. Neurology*, 5(11), 610–20. doi:10.1038/nrneurol.2009.159
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 64(6), 479–489.
- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013a). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), 764–72. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002

- Ohgaki, H., & Kleihues, P. (2013b). The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical cancer research*, 19(4), 764–772. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(5), 359–371. doi:10.1038/nrm1911
- Paquet, D., Bhat, R., Sydow, A., Mandelkow, E.-M., Berg, S., Hellberg, S., ... Haass, C. (2009). A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), 1382–95. doi:10.1172/JCI37537
- Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., & Nesland, J. M. (1997). 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochemistry and photobiology*, 65(2), 235–351. doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb08549.x
- Polom, K., Murawa, D., Rho, Y.-S., Nowaczyk, P., Hünnerbein, M., & Murawa, P. (2011). Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology: a literature review. *Cancer*, 117(21), 4812–4822. doi:10.1002/cncr.26087
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873–887. doi:10.1016/j.cell.2011.08.039
- Preusser, M., de Ribaupierre, S., Wöhrer, A., Erridge, S. C., Hegi, M., Weller, M., & Stupp, R. (2011). Current concepts and management of glioblastoma. *Annals of neurology*, 70(1), 9–21. doi:10.1002/ana.22425
- Preusser, M., Capper, D., Ilhan-Mutlu, A., Berghoff, A. S., Birner, P., Bartsch, R., ... von Deimling, A. (2012a). Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta neuropathologica*, 123(2), 205–22. doi:10.1007/s00401-011-0933-9
- Preusser, M., Winkler, F., Collette, L., Haller, S., Marreaud, S., Soffietti, R., ... Weber, D. C. (2012b). Trial design on prophylaxis and treatment of brain metastases: lessons learned from the EORTC Brain Metastases Strategic Meeting 2012. *European journal of cancer*, 48(18), 3439–3447. doi:10.1016/j.ejca.2012.07.002
- Raabe, A., Beck, J., Gerlach, R., Zimmermann, M., & Seifert, V. (2003). Near-infrared indocyanine green video angiography: a new method for intraoperative assessment of vascular flow. *Neurosurgery*, 52(1), 132–139.
- Reithmeier, T., Lopez, W. O., Doostkam, S., Machein, M. R., Pinsker, M. O., Trippel, M., & Nikkhah, G. (2013). Intraindividual comparison of histopathological diagnosis obtained by stereotactic serial biopsy to open surgical resection specimen in patients with intracranial tumours. *Clinical neurology and neurosurgery*, null(null). doi:10.1016/j.clineuro.2013.05.019

- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., ... De Maria, R. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 468(7325), 824–828. doi:10.1038/nature09557
- Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., ... Carmeliet, P. (2011). HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer cell*, 19(1), 31–44. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.009
- Sahai, E. (2007). Illuminating the metastatic process. *Nature reviews. Cancer*, 7(10), 737–749. doi:10.1038/nrc2229
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., ... Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*, 355(24), 2542–2550. doi:10.1056/NEJMoa061884
- Schaafsma, B. E., Mieog, J. S. D., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., Kuppen, P. J. K., Löwik, C. W. G. M., ... Vahrmeijer, A. L. (2011). The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *Journal of surgical oncology*, 104(3), 323–32. doi:10.1002/jso.21943
- Scheibe, S., Dorostkar, M. M., Seebacher, C., Uhl, R., Lison, F., & Herms, J. (2011). 4D in vivo 2-photon laser scanning fluorescence microscopy with sample motion in 6 degrees of freedom. *Journal of neuroscience methods*, 200(1), 47–53. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.06.013
- Schouten, L. J., Rutten, J., Huveneers, H. a. M., & Twijnstra, A. (2002). Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer*, 94(10), 2698–2705. doi:10.1002/cncr.10541
- Sizoo, E. M., Braam, L., Postma, T. J., Pasman, H. R. W., Heimans, J. J., Klein, M., ... Taphoorn, M. J. B. (2010). Symptoms and problems in the end-of-life phase of high-grade glioma patients. *Neuro-oncology*, 12(11), 1162–1166. doi:10.1093/neuonc/nop045
- Soffietti, R., Rudà, R., & Trevisan, E. (2008). Brain metastases: current management and new developments. *Current opinion in oncology*, 20(6), 676–684. doi:10.1097/CCO.0b013e32831186fe
- Squadrino, M. L., & De Palma, M. (2011). Macrophage regulation of tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Molecular aspects of medicine*, 32(2), 123–45. doi:10.1016/j.mam.2011.04.005
- Steeg, P. S., Camphausen, K. a, & Smith, Q. R. (2011). Brain metastases as preventive and therapeutic targets. *Nature reviews. Cancer*, 11(5), 352–363. doi:10.1038/nrc3053

- Stepp, H., Beck, T., Pongratz, T., Meinel, T., Kreth, F.-W., Tonn, J. C., & Stummer, W. (2007). ALA and Malignant Glioma: Fluorescence-Guided Resection and Photodynamic Treatment. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 26(2), 157–164. doi:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v26.i2.110
- Stummer, W, Stepp, H., Möller, G., Ehrhardt, A., Leonhard, M., & Reulen, H. J. (1998). Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue. *Acta neurochirurgica*, 140(10), 995–1000.
- Stummer, Walter, Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., & Reulen, H.-J. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The lancet oncology*, 7(5), 392–401. doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., ... Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10), 987–996. doi:10.1056/NEJMoa043330
- Sturm, M. B., Joshi, B. P., Lu, S., Piraka, C., Khondee, S., Elmunzer, B. J., ... Wang, T. D. (2013). Targeted Imaging of Esophageal Neoplasia with a Fluorescently Labeled Peptide: First-in-Human Results. *Science translational medicine*, 5(184), 184ra61. doi:10.1126/scitranslmed.3004733
- Thomas, M., Kienast, Y., Scheuer, W., Bähner, M., Kaluza, K., Gassner, C., ... Klein, C. (2013). A novel angiopoietin-2 selective fully human antibody with potent anti-tumoral and anti-angiogenic efficacy and superior side effect profile compared to pan-angiopoietin-1/-2 inhibitors. *PloS one*, 8(2), e54923. doi:10.1371/journal.pone.0054923
- Tong, R. T., Boucher, Y., Kozin, S. V., Winkler, F., Hicklin, D. J., & Jain, R. K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer research*, 64(11), 3731–3736. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0074
- Van Dam, G. M., Themelis, G., Crane, L. M. a, Harlaar, N. J., Pleijhuis, R. G., Kelder, W., ... Ntziachristos, V. (2011). Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. *Nature medicine*, 17(10), 1315–1319. doi:10.1038/nm.2472
- Von Baumgarten, L., Brucker, D., Tirniceru, A., Kienast, Y., Grau, S., Burgold, S., ... Winkler, F. (2011). Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells. *Clinical cancer research*, 17(19), 6192–205. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1868

- Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K. E., Geber, A., ... Tabar, V. (2010). Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*, 468(7325), 829–833. doi:10.1038/nature09624
- Wang, L. V. & Hu, S. (2012). Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6075), 1458–1462. doi:10.1126/science.1216210
- Watters, J. J., Schartner, J. M., Badie, B., & Tumors, B. (2005). Microglia Function in Brain Tumors. *Journal of Neuroscience Research*, 455(81), 447–455. doi:10.1002/jnr.20485
- Weis, S. M., & Cheres, D. a. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine*, 17(11), 1359–1370. doi:10.1038/nm.2537
- Widhalm, G., Minchev, G., Woehrer, A., Preusser, M., Kiesel, B., Furtner, J., ... Wolfsberger, S. (2012). Strong 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence is a novel intraoperative marker for representative tissue samples in stereotactic brain tumor biopsies. *Neurosurgical review*, 35(3), 381–391. doi:10.1007/s10143-012-0374-5
- Winkler, F., Kozin, S. V, Tong, R. T., Chae, S.-S., Booth, M. F., Garkavtsev, I., ... Jain, R. K. (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer cell*, 6(6), 553–563. doi:10.1016/j.ccr.2004.10.011
- Winkler, F., Kienast, Y., Fuhrmann, M., Von Baumgarten, L., Burgold, S., Mitteregger, G., ... Herms, J. (2009). Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis. *Glia*, 57(12), 1306–1315. doi:10.1002/glia.20850
- Wittekind, D. (1958). Die Vitalfärbung des Mäuseasciteskarzinoms mit Acridinorange. *Zeitschrift für Zellforschung*, 104(49), 58–104.
- Wolf, Y., Yona, S., Kim, K.-W., & Jung, S. (2013). Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(26). doi:10.3389/fncel.2013.00026
- Workman, P., Aboagye, E. O., Balkwill, F., Balmain, A., Bruder, G., Chaplin, D. J., ... Eccles, S. A. (2010). Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British journal of cancer*, 102(11), 1555–1577. doi:10.1038/sj.bjc.6605642
- Wrobel, C. J., Meltzer, H., Lamond, R., & Alksne, J. F. (1994). Intraoperative assessment of aneurysm clip placement by intravenous fluorescein angiography. *Neurosurgery*, 35(5), 970–973.
- Xu, H.-T., Pan, F., Yang, G., & Gan, W.-B. (2007). Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nature neuroscience*, 10(5), 549–551. doi:10.1038/nn1883



- Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J., & Gan, W.-B. (2010). Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nature protocols*, 5(2), 201–208. doi:10.1038/nprot.2009.222
- Yuan F, Leunig M, Berk DA, Jain RK. (1993). Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvasc Research*, 45(3):269-289.
- Yuan, Fan, Salehi, H. A., Boucher, Y., Vasthare, U. S., Tuma, R. F., & Jain, R. K. (1994). Vascular Permeability and Microcirculation of Gliomas and Mammary Carcinomas Transplanted in Rat and Mouse Cranial Windows. *Cancer Research*, 4564–4568.
- Yuan, F, Chen, Y., Dellian, M., Safabakhsh, N., Ferrara, N., & Jain, R. K. (1996). Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), 14765–14770.
- Zhang, X., Zhang, W., Cao, W.-D., Cheng, G., Liu, B., & Cheng, J. (2012). A review of current management of brain metastases. *Annals of surgical oncology*, 19(3), 1043–50. doi:10.1245/s10434-011-2019-2
- Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178–201. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.003

---

## **8 Anhang**

### **8.1 Lebenslauf**

## 8.2 Eigene Veröffentlichungen

### 8.2.1 Publikationen

Combined VEGF-A and Ang-2 inhibition and its effects on established brain metastases with and without additional chemotherapy

Brucker D; von Baumgarten L, Kienast Y, Thomas M; Winkler F. Herms J,  
In Vorbereitung

Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients

Eigenbrod S., Trabold R., Brucker D., Erös C., Egensperger R., La Fougere C., Göbel W., Rühm A., Kretzschmar H.A., Tonn J., Herms J., Giese A., Kreht FW.  
Acta Neurochirurgica, eingereicht

Characterization of Three Ammonium Transporters of the Glomeromycotan Fungus Geosiphon pyriformis.

Ellerbeck M, Schüßler A, Brucker D, Dafinger C, Loos F, Brachmann A.  
Eukaryot Cell. 2013 Nov;12(11):1554-62. doi: 10.1128/EC.00139-13.

Optical needle endoscope for safe and precise stereotactically guided biopsy sampling in neurosurgery.

Göbel W, Brucker D, Kienast Y, Johansson A, Kniebühler G, Rühm A, Eigenbrod S, Fischer S, Goetz M, Kreth FW, Ehrhardt A, Stepp H, Irion KM, Herms J.  
Opt Express. 2012 Nov 19;20(24):26117-26. doi: 10.1364/OE.20.026117.

A window into metastasis.

Brucker D, Herms J.  
Sci Transl Med. 2012 Oct 31;4(158):158fs39. doi: 10.1126/scitranslmed.3005053.

Bevacizumab has differential and dose-dependent effects on glioma blood vessels and tumor cells.

von Baumgarten L, Brucker D, Tirniceru A, Kienast Y, Grau S, Burgold S, Herms J, Winkler F.  
Clin Cancer Res. 2011 Oct 1;17(19):6192-205. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1868.

### 8.2.2 Vorträge

Neurotax-Optical needle endoscopy for fluorescence guided biopsy sampling in brain tumor diagnostics

David Brucker, Werner Goebel, Yvonne Kienast, Ann Johansson, Gesa Palte, Adrian Rühm, Sabina Eigenbrot, Markus Goetz, Friedrich-Wilhelm Kreth, Andre Ehrhardt, Herbert Stepp, Klaus-Martin Irion, Jochen Herms

Interact 2012, München

### 8.2.3 Poster

Intravital imaging of microglia/macrophage interactions with human brain tumor cell lines

Brucker, D; von Baumgarten, L; Winkler, F; Herms, J.

Brain Tumor 2013, Berlin

Real time in vivo 2-photon microscopy shows differential and dose-dependent effects of Bevacizumab on glioma blood vessels and tumor cells

Brucker, D.; von Baumgarten, L.; Tirniceru, A.; Kienast, Y.; Grau, S.; Burgold, S.; Herms, J.; Winkler, F.

Brain Tumor 2011, Berlin





### 8.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jochen Herms für die Betreuung und Finanzierung, Diskussion und Unterstützung und vor allem für das Vertrauen in mich und meine Arbeit.

Besonderen Dank an Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die gute Zusammenarbeit und die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Ich danke auch Prof. Steffen Dietzel für seine Zeit und Mühe als Zweitgutachter.

Besonderen Dank auch an Prof. Dr. Frank Winkler für die gute Zusammenarbeit, Motivation und Diskussion.

Vielen Dank an Yvonne Kienast und Luisa von Baumgarten, deren Hilfe und Zuversicht gerade zu Beginn meiner Arbeit von unschätzbarem Wert für mich waren.

Ich danke auch Markus Thomas und Werner Müller von Roche für die gute Kooperation.

Vielen Dank auch an alle Kooperationspartner des Neurotax Konsortiums, insbesondere Werner Goebel, Ann Johannsen, Adrian Rühm, Herbert Stepp und Gesa Palte mit denen ich spannende Experimente durchgeführt habe.

Vielen Dank auch an Dr. Sabina Eigenbrod und Prof. Kreth für die gute Zusammenarbeit.

Ganz herzlichen Dank geht auch an meine Kollegen am ZNP, insbesondere des Großraumbüros, die mir den Alltag durch ein fröhliches Klima bedeutend erheitert haben: Christian Jung, Steffen Burgold, Nadine Hoffmann, Severin Filser, Christian Schön, Finn Peters, Simon Ochs, Kamran Honarnejad und Sonja Blumenstock. Vielen Dank auch Dr. Manu Dorostkar und Julia Geyer für die Bemühungen während der Antragstellungen. Ich danke auch den Tierpflegern des ZNP, vor allem Pati, Michaela und Christine. Danke auch an Sonja Steinbach, Erik Griessinger, und Julia Knörndl für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Ich danke auch meinen Eltern für die kulinarische Unterstützung.

Natürlich stor Puss für Joana.